

Saskia Frenzel, BI07w1-B

**Time course and dose response
toxicity assay of Bisphenol A in three
dimensional culture of rat embryonic
liver progenitor cell (RLC-18) in a
minibioreactor**

**A combined evaluation biochemical tests,
morphological changes and gene expression analysis**

Bachelorarbeit

Herr Prof. Dr. rer. nat. Röbbbe Wünschiers

Herr Prof. Dr. med. Augustinus Bader

HOCHSCHULE MITTWEIDA

UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik

Mittweida, 2010

Bibliographische Beschreibung:

Frenzel, Saskia:

Time course and dose response toxicity assay of Bisphenol A in three dimensional culture of rat embryonic liver progenitor cell (RLC-18) in a minibioreactor: A combined evaluation biochemical tests, morphological changes and gene expression analysis.

- 2010. - 68 S.

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/

Informatik,

Bachelorarbeit, 2010

Referat:

Ziel dieser Bachelorarbeit ist es, nähere Informationen über die Toxizität von Bisphenol A zu gewinnen und dadurch eindeutigere Aussagen hinsichtlich seiner zukünftigen Verwendung zu treffen. Bisphenol A zählt zu den Stoffen mit östrogener Wirkung, der an Rezeptoren für Östrogene binden und so biologische Reaktionen hervorrufen kann. Dieser Stoff ist einer der weltweit am meisten produzierten Chemikalien und unter anderem in vielen Materialien mit Lebensmittelkontakt enthalten. Mit geeigneten Methoden soll in dieser Arbeit die Toxizität von Bisphenol A gegenüber Zellen der Zelllinie RLC-18, als Modell für den Menschen, bestimmt und die entsprechenden Rückschlüsse gezogen werden.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Formelverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis.....	8
1 Einleitung	9
2 Theorie	11
2.1 Bisphenol A	11
2.2 MTT	15
2.3 LDH	15
2.4 Cytochrom P450.....	16
2.5 Reverse Transkriptase	19
2.6 Polymerase Kettenreaktion	19
2.7 Western Blot	21
3. Material und Methoden	22
3.1 Kultivierung	22
3.1.1 Material	22
3.1.2 Methode.....	22
3.2 Live/dead-Assay.....	24
3.2.1 Material	24
3.2.2 Methode.....	25
3.3 MTT-Test	25
3.3.1 Material	25
3.3.2 Methode.....	25
3.4 LDH-Test	26
3.4.1 Material	26
3.4.2 Methode.....	26
3.5 Konfokalmikroskopie.....	27
3.5.1 Material	27
3.5.2 Methode.....	27
3.6 Protein- und RNA-Isolierung	27
3.6.1 Material	27
3.6.2 Methode.....	28

3.7 Proteinkonzentrationsbestimmung	29
3.7.1 Material	29
3.7.2 Methode.....	30
3.8 cDNA-Synthese.....	31
3.8.1 Material	31
3.8.2 Methode.....	31
3.9 Semiquantitative PCR	32
3.9.1 Material	32
3.9.2 Methode.....	33
3.10 Western Blot.....	34
3.10.1 Material	34
3.10.2 Methode.....	36
4 Ergebnisse	39
4.1 Fotos 24h nach Zugabe von Bisphenol A	39
4.2 Fotos 48h nach Zugabe von Bisphenol A	40
4.3 Green/Red-Assay 24h nach Zugabe von Bisphenol A.....	41
4.4 Green/Red-Assay 48h nach Zugabe von Bisphenol A.....	42
4.5 MTT-Test	43
4.6 LDH-Test	44
4.7 Konfokalmikroskopie.....	47
4.8 Semiquantitative PCR	48
4.9 Western Blot.....	51
5 Auswertung/Diskussion	53
6 Zusammenfassung.....	57
Anhang	58
Literaturverzeichnis.....	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Versuche	10
Abbildung 2: Biotransformation von Bisphenol A in Nagern und Menschen zu Bisphenol A-Glucuronid und Bisphenol A-Sulfat	13
Abbildung 3: Reduktion von MTT zu Formazan	15
Abbildung 4: durch Cytochrom P450 katalysierte Oxidationsreaktionen	18
Abbildung 5: Denaturierung der doppelsträngigen DNA	20
Abbildung 6: Annealing der Primer	20
Abbildung 7: Elongation	20
Abbildung 8: 6-well-Bioreaktor	23
Abbildung 9: Zellen 24h nach Zugabe von Bisphenol A	39
Abbildung 10: Zellen 48h nach Zugabe von Bisphenol A	40
Abbildung 11: durch live/dead-Assay gefärbte Zellen 24h nach Zugabe von Bisphenol A	41
Abbildung 12: durch live/dead-Assay gefärbte Zellen 48h nach Zugabe von Bisphenol A	42
Abbildung 13: grafische Darstellung der Ergebnisse vom MTT-Test 24h nach Zugabe von Bisphenol A	43
Abbildung 14: grafische Darstellung der Ergebnisse vom MTT-Test 48h nach Zugabe von Bisphenol A	43
Abbildung 15: grafische Darstellung der Ergebnisse vom LDH-Test 24h nach Zugabe von Bisphenol A	46
Abbildung 16: grafische Darstellung der Ergebnisse vom LDH-Test 48h nach Zugabe von Bisphenol A	46
Abbildung 17: Konfokalmikroskopie	47
Abbildung 18: Ergebnis der PCR mit GAPDH	48
Abbildung 19: Ergebnis der PCR mit Fmo1	49
Abbildung 20: Ergebnis der PCR mit Cyp2e1	49
Abbildung 21: Ergebnis der PCR mit Cyp1a2	50
Abbildung 22: Coomassie-gefärbtes Gel	51
Abbildung 23: Ponceau S-gefärbte Membran	51
Abbildung 24: Ponceau S-gefärbte Membran mit Proteinproben für die Kultivierung ohne Nanogel	52
Abbildung 25: Ponceau S-gefärbte Membran mit Proteinproben für die Kultivierung mit Nanogel	52

Abbildung 26: alle Bilder 24h nach Zugabe von Bisphenol A	60
Abbildung 27: alle Bilder 48h nach der Zugabe von Bisphenol A	63

Formelverzeichnis

Formel 1: Darstellung von Bisphenol A	12
Formel 2: durch LDH katalysierte Reaktion	15
Formel 3: Formel zur Bestimmung der LDH-Aktivität	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeine Informationen zu Bisphenol A	11
Tabelle 2: Effekte von Bisphenol A auf tierische Organismen.....	13
Tabelle 3: Standardreihe für BCA.....	30
Tabelle 4: Komponenten für die Eliminierungsreaktion genomischer DNA.....	31
Tabelle 5: Komponenten für die cDNA-Synthese	32
Tabelle 6: Ergebnisse vom LDH-Test 24h nach Zugabe von Bisphenol A	44
Tabelle 7: Ergebnisse vom LDH-Test 48h nach Zugabe von Bisphenol A	45

1 Einleitung

Das biologische System des Menschen umfasst eine Vielzahl von Stoffen, deren Eigenschaft es ist, in verschiedene Stoffwechselprozesse einzugreifen und diese sowohl in positiver als auch in negativer Weise zu beeinflussen. Dazu zählen die Stoffe mit östrogenen Wirkung, die an Rezeptoren für Östrogene binden und so biologische Reaktionen hervorrufen. Zu diesen Stoffen zählt Bisphenol A. Es hat das Potential, negative Effekte hervorzurufen, wie Neurotoxizität, Beeinflussung des kardiovaskulären Systems, reproduktive Abnormalitäten, Wachstums-toxizität und weitere andere Effekte. Bisphenol A zählt weltweit mit zu den am meisten produzierten Chemikalien. Es ist unter anderem in vielen Materialien mit Lebensmittelkontakt, wie Plastikverpackungen, Babyflaschen und Konservendosen, enthalten. Auch in Nuckeln und Abwasserleitungen kann man diese Substanz vorfinden. Hitze und andere Lösungsvorgänge können dafür sorgen, dass Bisphenol A in die Lebensmittel gelangt und so von Menschen aufgenommen werden kann. [Xing et al, 2010] Gerade Embryonen (über die Plazenta der Mutter), Babys und Kleinkinder können am meisten davon betroffen sein, da hier der Organismus noch in der Entwicklung und somit viel anfälliger für solche Stoffe ist. Die Risiken für den Menschen und die Umwelt gegenüber Bisphenol A sind jedoch seit Jahren kontrovers diskutiert. Die EU-Risikobewertung, die europäische Lebensmittelsicherheitsbehörde EFSA und das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) sehen für die europäischen Verbraucher und Verbraucherinnen kein Anlass zur Sorge. Das BfR z.B. sagte folgendes im Januar 2010 zu Bisphenol A in Babyflaschen: "Das BfR hält es nach dem gegenwärtigen wissenschaftlichen Kenntnisstand nicht für erforderlich, auf Babyfläschchen aus Polycarbonat zu verzichten." Einzelne europäische Länder und Institutionen jedoch schließen Gesundheitsgefährdungen nicht aus. Sie sehen Unsicherheiten in der EU-Bewertung. [Autor unbekannt 1, 2010] So das Umweltbundesamt Deutschlands: "Das Altstoffchemikalien-Programm der EU und die europäische Lebensmittelsicherheitsbehörde EFSA bewerten Produkte auf Bisphenol A-Basis für Verbraucherinnen und Verbraucher derzeit als unbedenklich. Kanada, Dänemark und Frankreich dagegen haben aus Vorsorgegründen Bisphenol A-haltige Babyflaschen und andere Produkte für Kinder verboten. [...] Aus Sicht des Umweltbundesamtes bestehen zwar noch Datenlücken, doch die vorliegenden Kenntnisse sollten ausreichen, die Verwendung bestimmter Bisphenol A-haltiger Produkte aus Vorsorgegründen zu beschränken." [Otto, von Mühlendahl, 2010] Die Meinungen sind also sehr unterschiedlich, ob Bisphenol A weiter, teilweise oder gar nicht mehr verwendet werden darf. Ziel dieser Arbeit ist es, nähere Informationen über die

Toxizität von Bisphenol A zu gewinnen und dadurch eindeutigere Aussagen hinsichtlich seiner zukünftigen Verwendung zu treffen. Dabei dient die Zelllinie von embryonalen Vorläuferzellen aus der Leber von Ratten (RLC-18) als ein alternatives Modell zu primären humanen embryonalen Leberzellen. Sie besitzen eine unendliche Proliferation, können besser einheitlich in Kulturen gehalten werden, sind leichter verfügbar und gut geeignet für die Fremdstoff-Biotransformation. [Giri et al, 2010] Nach einer Kultivierung auf normalen Platten, normalen Platten mit Nanogel und Bioreaktoren mit Nanogel sollen die Zellen verschiedenen Bisphenol A-Konzentrationen ausgesetzt werden, um nach 24h und 48h verschiedenen Tests, wie MTT-Test und dead/live-Assay, durchführen zu können. Mit diesen Tests soll die Toxizität von Bisphenol A untersucht werden. In Abbildung 1 ist dies schematisch dargestellt.

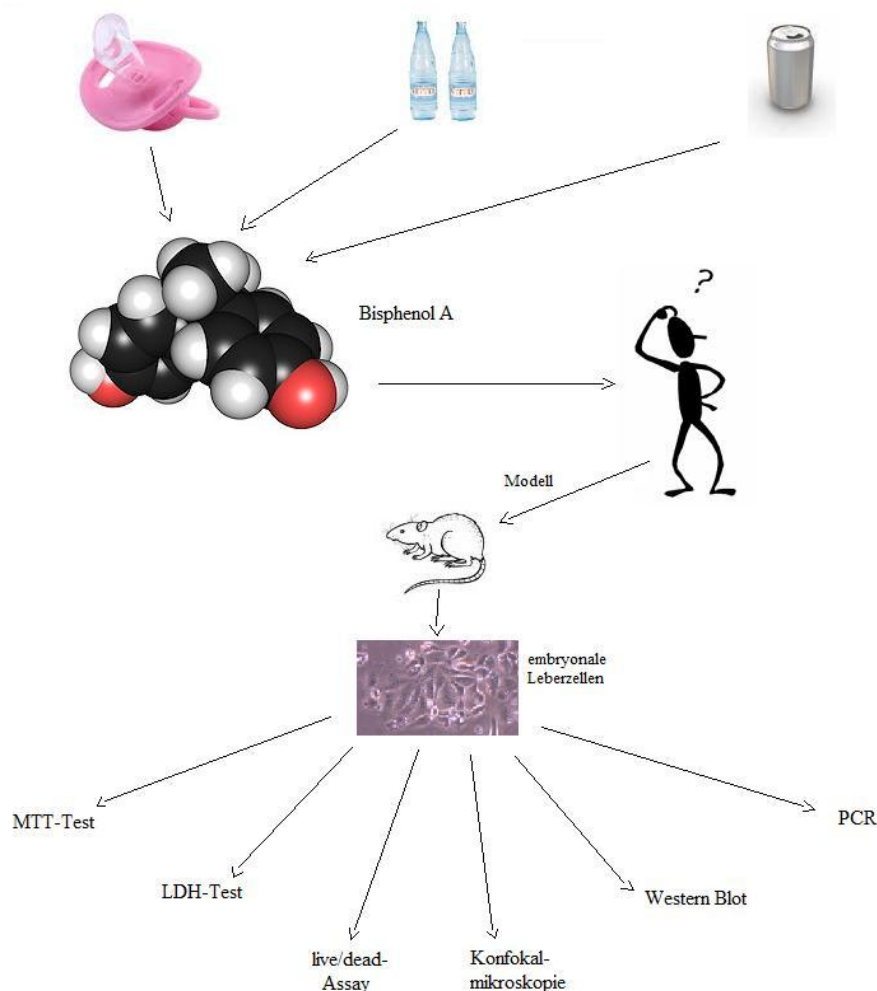



Abbildung 1: Schematische Darstellung der Versuche

2 Theorie

2.1 Bisphenol A

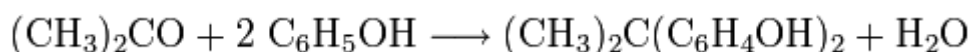
Bei Bisphenol A handelt es sich um eine chemische Verbindung aus der Gruppe der Diphenylmethan-Derivate. Es ist ein wichtiger und gleichzeitig viel diskutierter Umweltstoff mit einer Jahresproduktion von knapp 4 Millionen Tonnen weltweit. Seine stofflichen Eigenschaften und andere allgemeine Zusatzinformationen sind in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 1: Allgemeine Informationen zu Bisphenol A [Autor unbekannt i, 2010]

<i>Allgemein</i>	
Name	Bisphenol A
Andere Namen	2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)-propan 2-propan-diphenol-4 4,4'-Isopropylidendiphenol
Summenformel	$C_{15}H_{16}O_2$
CAS-Nummer	80-05-7
Kurzbeschreibung	helle Kristalle, Schuppen, Pulver oder Flocken
Eigenschaften	
Molare Masse	$228,28 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
Aggregatzustand	fest
Dichte	$1,2 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$
Schmelzpunkt	$155\text{--}156^\circ\text{C}$
Siedepunkt	220°C (500 Pa)
Löslichkeit	löslich in Alkohol, $300 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ in Wasser
Sicherheitshinweise	
R- und S-Sätze	R: 37-41-43-62-52 S: (2)-26-36/37-39-46-61
 <p>Gesundheits- schädlich (Xn)</p>	

Bisphenol A dient als Ausgangsstoff für einen höchst vielseitigen Kunststoff, das Polycarbonat, und für die Epoxidharze. Hier ist Bisphenol A fest in die Polymermatrix eingebunden. Weiterhin dient es als Additiv/Zusatzstoff in Spezialanwendungen, wo es chemisch nicht gebunden ist und somit relativ leicht freigesetzt werden kann. [Otto, von Mühlendahl, 2010] Bisphenol A kommt somit in verschiedenen Materialien mit Lebensmittelkontakt vor, beispielsweise in Babyflaschen, Essgeschirr (Teller, Tassen, Krügen, Bechern), Mikrowellengeschirr, Aufbewahrungsbehältern, Mehrwegwasser- und Milchflaschen und auffüllbaren Wasserbehältern, sowie Wasserleitungen. Die Epoxidphenolharze dienen als Innenbeschichtung für Konserven- und Getränkedosen sowie als Beschichtung für die Metalldeckel von Gläsern und Flaschen und als Oberflächenbeschichtung von Trinkwasserspeichertanks und Weinfässern. [Autor unbekannt j, 2007] Ebenfalls kann man diesen Stoff in medizinischen Geräten (z.B. Dialysegeräte) vorfinden und dient als Ausgangsstoff für Tetrabrombisphenol A (TBBPA). Dies ist ein Flammenschutzmittel, welches in der Umwelt wieder zu Bisphenol A umgewandelt wird. [Autor unbekannt l, 2010] Bisphenol A selbst wird durch die Kondensation von zwei Teilen Phenol mit einem Teil Aceton hergestellt (Formel 1). Chlorwasserstoff (HCl) und/oder Polystyrensulphonat dienen dabei als Katalysatoren. Um eine möglichst hohe Ausbeute zu erhalten, wird ein Überschuss von Phenol hinzugegeben. [Autor unbekannt i, 2010]

Formel 1: Darstellung von Bisphenol A [Autor unbekannt i, 2010]



Bisphenol A ist eine hormonaktive Substanz (endocrine disruptor) mit östrogenartiger Wirkung. Es wirkt ähnlich wie Östrogen, das weibliche Sexualhormon, und kann somit den hormonellen Zustand des menschlichen Körpers beeinflussen. Östrogen ist ein Hormon der Keimdrüsen und verantwortlich für die Proliferation der Uterusschleimhaut. Bisphenol A wirkt jedoch ca. 10.000 mal schwächer als Östrogen. Bei kontinuierlich aufgenommenen hohen Konzentrationen kann es an den Östrogenrezeptor (einem Bindungsort für weibliche Sexualhormone in der Zelle) binden und zu Verweiblichung, Fehlbildungen der Fortpflanzungsorgane und anderen Effekten führen. Die tolerierbare tägliche Aufnahmemenge liegt bei 50 µg/kg Körpergewicht. [Autor unbekannt k, 2009] Bisphenol A ist aber nicht akut giftig, verursacht keine Veränderungen am Erbgut und ist nicht Krebs erzeugend. [Otto, von Mühlendahl, 2010] Nicht nur in Menschen auch in Tieren (z.B. Fische

und Vögel) kann es zu Schädigungen kommen, z.B. zur Fehlbildung der Fortpflanzungsorgane. Dies kann man auch Tabelle 2 entnehmen.

Tabelle 2: Effekte von Bisphenol A auf tierische Organismen [Autor unbekannt I, 2010]

Organismengruppe	Wirkmechanismus	Beobachtete Effekte im Organismus
Frösche	Aktivierung des Östrogenrezeptors, Auswirkungen auf Schilddrüsenhormone	Verweiblichung, Fehlbildungen
Vögel	Bindung an Östrogenrezeptor	Fehlbildungen an Fortpflanzungsorganen
Fische	Aktivierung des Östrogenrezeptors	Fehlbildungen der Fortpflanzungsorgane, Verringerung der Spermienqualität, Verzögerung der Spermienreife, Verschiebung des Geschlechterverhältnisses
Schnecken	Nicht eindeutig bekannt	Erhöhte Eiproduktion, Missbildungen der Fortpflanzungsorgane bei Weibchen und Männchen
Krebstiere	Nicht eindeutig bekannt	Erhöhte Eiproduktion
Insekten	Nicht eindeutig bekannt	Verzögerter Schlupf

Die orale Aufnahme von Bisphenol A ist eine Hauptquelle für die Exposition in allen Altersgruppen. In typischen Gebrauchssituationen befinden sich unter 3 µg Bisphenol A pro kg Lebensmittel, was sehr gering ist. Unter extremen Bedingungen (z.B. Erhitzen) können in Einzelfällen Werte über 20 µg Bisphenol A pro kg auftreten. [Otto, von Mühlendahl, 2010] Die biologische Halbwertszeit beträgt beim Menschen weniger als 6 h. Die Biotransformation von Bisphenol A zu Bisphenol A-Glucuronid ist der wichtigste Weg der Biotransformation von Bisphenol A in Primaten und Ratten (siehe Abbildung 2).

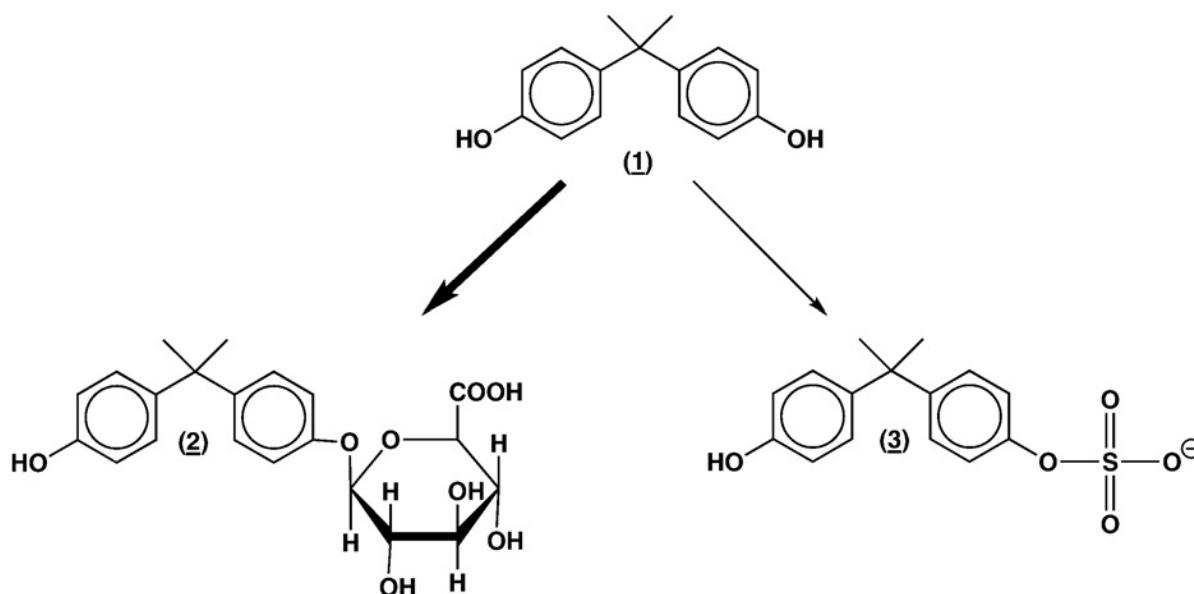


Abbildung 2: Biotransformation von Bisphenol A (1) in Nagern und Menschen zu Bisphenol A-Glucuronid (2) und Bisphenol A-Sulfat (3) [Dekant, Völkel, 2008]

Einige der gebildeten Metaboliten können eine höhere Affinität zu dem Östrogen-Rezeptor im Vergleich zu Bisphenol A besitzen. Es gibt jedoch keinen Beweis, dass solche Metaboliten in erheblichem Umfang bei Ratten oder bei Primaten *in vivo* gebildet werden. Als Grund dafür ist die effektive Glucuronidierung von Bisphenol A zu nennen. [Dekant, Völkel, 2008] Ratten dienen oft als experimentelles Modell. Wie beim Menschen ist der Hauptmetabolit von Bisphenol A bei Ratten Bisphenol A-Glucuronid (in der Leber gebildet). Doch gibt es bei der Toxikokinetik von Bisphenol A wesentliche Unterschiede zwischen Nagern und Menschen bezüglich der Verstoffwechselung dieses Stoffes im Körper. Große Unterschiede bestehen z.B. in der Verteilung von Bisphenol A-Glucuronid, da dieser Metabolit bei Nagern und Primaten auf unterschiedlichen Wegen aus der Leber gelangt. Dies hat eine große Bedeutung für die Relevanz der beobachteten Wirkungen von Bisphenol A bei empfindlichen Nagerstämmen, einschließlich der Wirkungen niedriger Dosen, im Hinblick auf die Bewertung des Gesundheitsrisikos für den Menschen. Bei Ratten kommt es ebenfalls zu der Glucuronidierung, jedoch wird das gebildete Bisphenol A-Glucuronid von der Leber in Darm und Galle transportiert. Im Darm kann es zur Aufspaltung des Bisphenol A-Glucuronid wieder in Bisphenol A und Glucuronsäure kommen und Bisphenol A gelangt wieder in den Blutkreislauf. Dies führt zu einer Verlängerung der Eliminationszeit von Bisphenol A bei Nagern. [Autor unbekannt j, 2007] Auch in der Umwelt ist Bisphenol A vorzufinden. Dabei gelangt es über das Abwasser in die Umwelt, vornehmlich in Gewässer. Der Großteil kommt hierbei aus Betrieben, die Bisphenol A produzieren und verarbeiten. Mit dem Abwasserstrom kommt Bisphenol A dann entweder in die industriellen Kläranlagen der Unternehmen oder in kommunale Kläranlagen. Sind die Abwasseranlagen mit ausreichend Sauerstoff (aerob) versorgt, können die Mikroorganismen Bisphenol A im Wasser gut abbauen. Innerhalb von 2–17 Tagen ist es nahezu komplett verschwunden. Ist jedoch zu wenig Sauerstoff vorhanden (anaerob), verringert sich der Bisphenol A-Gehalt entweder gar nicht oder nur äußerst langsam. Ein weiterer Faktor: Kläranlagen eliminieren Bisphenol A nur unterschiedlich gut. Es gibt Abbauraten von 61–98 %, abhängig von dem Verfahren zur Abwasserreinigung und der Leistung der Kläranlage. Enthält nun gereinigtes Abwasser noch Bisphenol A, gelangt der Stoff aus den Kläranlagen in die Gewässer. Hier kann es unter aeroben Verhältnissen weiter abgebaut werden, jedoch kann sich die Chemikalie auch in die Sedimente ablagern und wird dort nicht vollständig abgebaut. Dadurch ist es in Restmengen im Gewässer vorhanden. [Autor unbekannt l, 2010]

2.2 MTT

Der Nachweis der Zellvitalität kann mittels des MTT-Tests durchgeführt werden, der 1983 von Mosmann beschrieben wurde. [Gerecke, 2006] Dabei wird das gelbe, wasserlösliche 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu violetterm, wasser-unlöslichem Formazan reduziert. Hierfür sind die mitochondrialen Dehydrogenasen der Zellen für die Umwandlung von dem in die Zelle aufgenommenem gelbem Tetrazoliumsalz in Formazan zuständig (Abbildung 3) [Autor unbekannt b, 2010], welches als dunkelblauer-violetter kristalliner Niederschlag zu erkennen ist. [Gerecke, 2006]

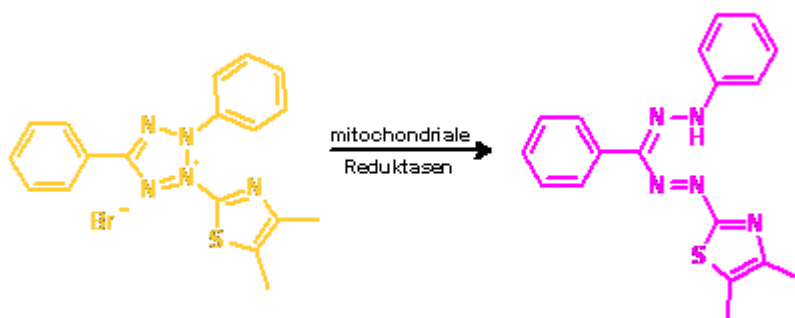


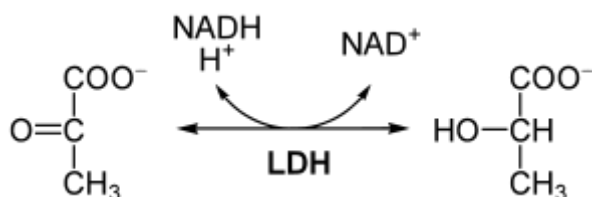
Abbildung 3: Reduktion von MTT zu Formazan [Autor unbekannt b, 2010]

Das Formazan kann anschließend mit geeigneten Detergentien aus den Zellen gelöst und für eine photometrische Messung verwendet werden. Hierbei besteht eine Korrelation zwischen der gemessenen Konzentration an Formazan mit dem Proliferationsverhalten der Zellen. [Autor unbekannt b, 2010]

2.3 LDH

Bei dem LDH-Test spielt die Lactatdehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) eine besondere Rolle. Hierbei handelt es sich um ein Enzym, welches die Oxidation von Lactat zu Pyruvat mit der gleichzeitigen Reduktion von NAD^+ zu NADH/H^+ bzw. dessen Rückreaktion katalysiert (Formel 2). [Autor unbekannt a, 2010]

Formel 2: durch LDH katalysierte Reaktion [Autor unbekannt a, 2010]



Es gibt dabei zwei Haupttypen von Lactatdehydrogenase: die M-Form und die H-Form. Es existiert auch eine dritte Form, die nur in Spermien vorkommt. Die zwei Hauptformen haben eine ähnliche Größe und Form und unterscheiden sich nur in den katalytischen Eigenschaften. Die M-Form katalysiert die Umwandlung von Pyruvat zu Lactat. Diese Art kommt hauptsächlich in der Skelettmuskulatur vor und wird aktiviert, wenn die Muskeln anaerob arbeiten müssen. Die H-Form dient der Umwandlung von Lactat zu Pyruvat, also der umgekehrten Reaktion. Sie kommt hauptsächlich im Herzen vor, wenn eine konstante Versorgung mit Sauerstoff vorliegt. Das Lactat dient als aerobe Energiequelle. Beide Arten sind so ähnlich aufgebaut, dass Komplexe mit einer Mischung aus beiden Arten gebildet werden können, z.B. mit zwei H-Ketten und zwei M-Ketten. [Goodsell, 2008] LDH kann man in so gut wie allen Zellen vorfinden, wobei es im Cytoplasma gelöst vorliegt. Bei höheren Tieren kommt LDH in freier Form auch in der Hämolymphe oder im Blut vor. Die Lactatdehydrogenase dient als klinischer Laborparameter, wobei sie bei Erhöhung, eine Gewebs-, bzw. eine Organschädigung anzeigt. Der Referenzbereich für Messungen bei 37 °C nach IFCC liegt bei Menschen allgemein unter 245 U/l. [Autor unbekannt a, 2010] Von der Lactatdehydrogenase gibt es 5 Isoenzyme. Die normalerweise im Labor gemessene LDH Aktivität entspricht der Gesamt-Aktivität der Lactatdehydrogenase. Durch die Bestimmung der LDH-Isoenzyme können zusätzliche Informationen gewonnen werden, vor allem wo die Schädigung stattgefunden hat. Im Herzmuskel und in den roten Blutkörperchen liegt vorwiegend LDH-1 und LDH-2 vor, in der Milz, der Lunge und den Lymphknoten das LDH-3 und in der Leber und im Muskel LDH-4 und LDH-5. [Hübl, 2003]

2.4 Cytochrom P450

Die P450-Monooxygenasen, Peroxygenasen, Esterasen, Amidasen, Phosphatasen und Reduktasen gehören zu den Phase-I-Enzymen, wobei die P450-Monooxygenasen zu den wichtigsten zählen. Der Phase-I-Metabolismus dient zur Entgiftung von Fremdstoffen. Zu den Phase-I-Reaktionen gehören die Oxidationen, die Reduktionen, die Hydrolysen und die Isomerisierungen. Dabei werden zusätzliche funktionelle Gruppen, wie –OH, –NH₂, –SH oder –COOH eingefügt. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung, was dazu führt, dass die Metaboliten eine geringere Phytotoxizität und höhere Polarität erhalten. Den Phase-I-Reaktionen und besonders den durch P450-Monooxygenasen katalysierten wird eine Schlüsselrolle bei der Entgiftung von Xenobiotika zugeschrieben. Häufig bedarf es erst einer Aktivierung durch eine der Phase-I-Reaktionen, um den Fremdstoff einer weiteren

Metabolisierung in Phase-II zugänglich zu machen. [Bode, 2004] Die Cytochrom P450-Enzyme besitzen eine molekulare Masse zwischen 44 und 55kDa, gehören zu der großen Gruppe von Häm-Proteinen und enthalten ein Eisen-Protoporphyrin IX als prosthetische Gruppe. Sie sind ubiquitär in Bakterien, Pflanzen und Tieren und in der Phospholipidmatrix des endoplasmatischen Retikulums eukaryontischer Zellen enthalten. Im Säugerorganismus besitzt die Leber den höchsten Cytochrom P450-Gehalt und damit auch die höchste Aktivität an P450. Es weist eine geringe Umsatzgeschwindigkeit für Fremdstoffe auf, welche aber durch hohe Enzymkonzentrationen in den metabolisierenden Geweben, vor allem in der Leber, kompensiert werden. Für die Aktivität der Cytochrom P450-Enzyme sind zudem Phospholipide notwendig. [Autor unbekannt f, 2010] Die Namensgebung beginnt immer mit der Abkürzung „CYP“, gefolgt von einer alphanumerischen Bezeichnung für die Genfamilie (>40 % Sequenzübereinstimmung), die Subfamilie (55 % Sequenzübereinstimmung) und die einzelner Proteine. Es sind 281 Familien bekannt, die sich auf Säuger, Mikroorganismen (Hefen, Pilze, Bakterien), Pflanzen und Insekten verteilen. Sie können sowohl als Oxidasen, Peroxydasen oder auch unter anaeroben Bedingungen als Reduktasen fungieren. Von den P450-Enzymen werden verschiedene oxidative Reaktionen katalysiert, welche sich in drei Mechanismen einteilen lassen:

- Einführung eines Sauerstoffatoms in eine Wasserstoff- σ -Bindung (Hydroxylierung)
- Addition eines Sauerstoffatoms an eine π -Bindung (Epoxydierung)
- Addition eines Sauerstoffatoms an ein nicht bindendes Elektronenpaar

Die einfachen Oxidationen führen zu Hydroxylierungen von Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefelatomen, N-, S-, O-Desalkylierungen, Desaminierungen und Epoxidierungen (Abbildung 4).

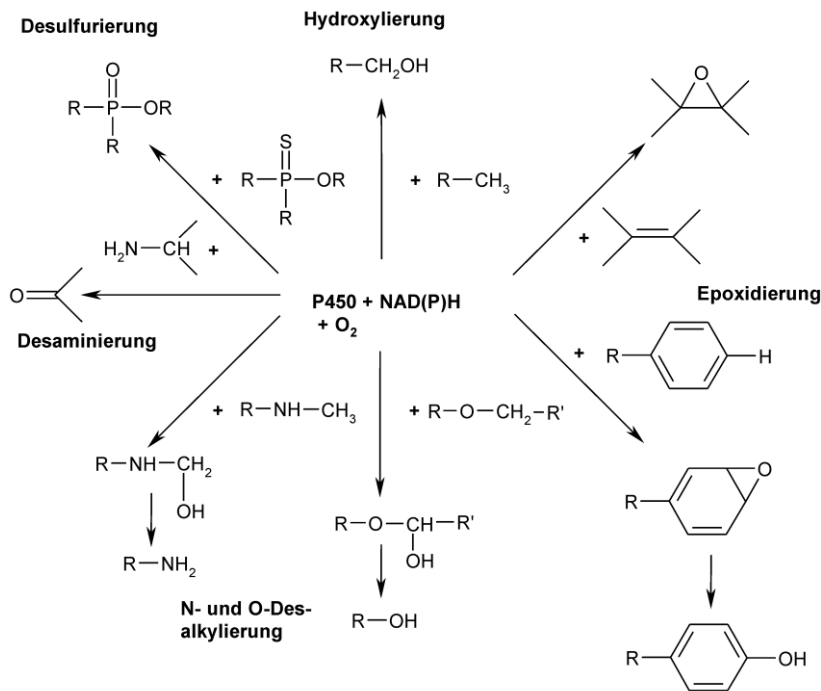


Abbildung 4: durch Cytochrom P450 katalysierte Oxidationsreaktionen [Bode, 2004]

Eher atypische P450-Reaktionen sind Reduktionen, Dimerisierungen, Isomerisierungen und Dehydrierungen. Die verschiedenen Isoenzyme katalysieren meist nur eine bestimmte Reaktion, andere hingegen haben eine breite Substratspezifität. Exogene Substanzen im Säuger werden überwiegend von P450-Isoenzymen der Familien CYP1, CYP2, CYP3 und CYP4 umgesetzt. Säuger beinhalten P450-Enzyme mit einer breiten und überlappenden Substratspezifität und sie metabolisieren eine Bandbreite exogener Substanzen sowohl von industrieller Herkunft (Pestizide, Umweltchemikalien, Pharmaka) als auch aus dem Bereich der Naturstoffe (u. a. Isoflavone). Der Gehalt und die Aktivität von P450-Enzymen werden durch zahlreiche Faktoren wie Alter, Geschlecht, Spezies, Hormone und besonders durch Medikamente, Umweltchemikalien und Nahrungsinhaltsstoffe beeinflusst. [Bode, 2004]

2.5 Reverse Transkriptase

Bei der reversen Transkriptase handelt es sich um ein Enzym, welches die Umschreibung von RNA in DNA katalysieren kann. Es ist somit eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Vor allem bei den Retroviren spielt sie eine wichtige Rolle. Aber auch bei Menschen kann man sie auffinden. So gehört z.B. die humane Telomerase-Reverse Transkriptase (hTERT) als ein Teil der Telomerase dazu. Sie ist für die Replikation verkürzter Telomere wieder auf ihre ursprüngliche Länge zuständig. [Autor unbekannt c, 2010] Dieses Verfahren wird vor allem in der Gentechnik verwendet. Das dabei entstehende Produkt wird als cDNA bezeichnet, die also eine Kopie von einer Messenger-RNA (mRNA) darstellt. [Autor unbekannt d, 2010]

2.6 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion wird auch kurz als PCR (polymerase chain reaction) bezeichnet. Diese Reaktion dient zur Vermehrung von DNA. Es können also schnell und einfach beliebige DNA-Sequenzen vervielfältigt werden, für die schon kleinste Mengen genetischen Materials ausreichen. Mitte der 80er Jahre wurde dieses Prinzip vom US-Amerikaner Kary B. Mullis entdeckt, wofür er 1993 den Nobelpreis für Chemie bekam. Der wichtigste Bestandteil dabei bildet die Polymerase, ein temperaturstabilen Enzyme aus hitzeliebenden Bakterien, welches essentiell für die Vervielfältigung ist. [Autor unbekannt e, 2010] Ein weiterer wichtiger Bestandteil sind die Primer, kurze Stränge von 18-35 Basen, die den Start der PCR bilden und zur Startsequenz des gesuchten Genabschnittes passen. Die PCR besteht aus drei Phasen. Die erste Phase ist die Denaturierung. Hier wird durch das Einwirken einer hohen Temperatur (95°C) der DNA-Doppelstrang in die zwei Einzelstränge aufgetrennt (Abbildung 5) So können die Primer an die passenden DNA-Abschnitte binden.



Abbildung 5: Denaturierung der doppelsträngigen DNA [Hübl, 2004]

Dies geschieht in der so genannten Annealing-Phase, wo die Primer an die entsprechenden DNA-Abschnitte der beiden DNA-Einzelstränge hybridisieren (Abbildung 6). Dabei hat jeder Primer seine individuelle Annealing-Temperatur.



Abbildung 6: Annealing der Primer [Hübl, 2004]

Die dritte Phase ist die Elongationsphase. Hier werden mittels der Polymerase die Nukleotide an die Stränge synthetisiert, wodurch neue DNA-Stränge gebildet werden (Abbildung 7). Das Ganze geschieht bei einer Temperatur von 72°C. Bereits nach 20 Zyklen liegt eine millionenfache Anreicherung des DNA-Abschnitts vor. [Hübl, 2004]



Abbildung 7: Elongation [Hübl, 2004]

Ob der gewünschte Genabschnitt amplifiziert wurde, kann mit der Agarose-Gelelektrophorese überprüft werden, wo diese Abschnitte der Größe nach aufgetrennt und durch fluoreszierende Stoffe, die sich an die doppelsträngige DNA anlagern, sichtbar gemacht werden können.

2.7 Western Blot

Beim Western Bot handelt es sich um eine Methode, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf einen geeigneten Träger, z.B. Nitrocellulose oder Nylon übertragen werden. Es wird also eine Kopie des Gels produziert. Die Proteine werden dabei auf dem Filter immobilisiert. Dies geschieht durch die Bindung der Makromoleküle an Nitrocellulose über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoff-Brücken. Unter geeigneten Bedingungen bleiben beim Transfer sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine, z.B. deren enzymatische Aktivität, erhalten. Nach dem Transfer können sie mit verschiedenen Liganden, Antikörpern, Lectinen oder Enzymsubstraten behandelt werden. Es können so einzelne Proteine in einem komplexen Gemisch anderer Proteine qualitativ und quantitativ bestimmt und identifiziert werden. Ähnliche Methoden sind der Southern Blot (zum Nachweis von DNA-Fragmenten) und der Northern-Blot (zum Nachweis von RNA-Molekülen). Das Western Blotting kann auch als Immuno-Blotting oder enzymgekoppeltes Immunoelktrotransfer-Blot-Verfahren bezeichnet werden. Die Bindung der Antikörper an die immobilisierten Proteine kann auf verschiedene Weise stattfinden. Zum einen gibt es den direkten Nachweis mit Antikörper, die mit Enzymen (z.B. Peroxidase, alkalische Phosphatase, Beta-Galactosidase) konjugieren, oder in anderer Weise (z.B. mit Biotin, Gold-Markierung, Lumineszens-Systeme) markiert werden. Anders die indirekte Nachweismethode, wo ein bereits gebundener, spezifischer Antikörper durch einen Sekundärantikörper nachgewiesen wird, der seinerseits in geeigneter Weise markiert ist. Die zu analysierenden Proteine werden also vorher durch eine quer zum Gel verlaufende Elektrophorese auf die Transfermembran übertragen. Danach ist es wichtig, dass die Membran vor der weiteren Verwendung mit Blockierungsreagenzien behandelt wird, damit alle unbesetzten Bindungsstellen auf der Membran maskiert werden. [Autor unbekannt g, 2010] Der Western Blot läuft also in folgenden Schritten ab. Im 1. Schritt wird das Proteingemisch mittels einer Gel-Elektrophorese in einer Trägermatrix (SDS-PAGE, Native-PAGE, isoelektrische Fokussierung, 2D-Gelelektrophorese, usw.) entsprechend der Protein-Größe, -Ladung oder anderer Eigenschaften in einzelne Proteinbanden aufgetrennt. Im 2. Schritt werden die getrennten Proteinbanden aus dem Gel auf eine feste Trägermembran (z.B. aus Nitrozellulose, Nylon oder PVDF) übertragen, das Blotting. Der 3. Schritt besteht aus der Detektion der Antikörper-Bindung, bei dem Antikörperkonjugate, die markiert sind, z.B. mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Enzymen für eine nachfolgende Farbreaktion, oder radioaktiv zur anschließenden Autoradiographie, verwendet werden. Die Auswertung des Blottings erfolgt

über verschiedene Imaging Systeme (Lumineszenz, Farbreaktion, Autoradiographie, usw.). Nach der Immundetektion können die gebundenen Antikörper wieder entfernt und die Membran für weitere Analysen mit anderen Antikörpern bereit gemacht werden. Dieser Vorgang wird als Stripping bezeichnet. [Autor unbekannt h, 2010]

3. Material und Methoden

3.1 Kultivierung

3.1.1 Material

- Zellen der Zelllinie RLC-18 (embryonale Leberzellen der Ratte)
- Medium für RLC-18-Zellen (V = 500 ml)

Williams' Medium E		Biochrom
5% FCS (fetales Kälberserum)	25 ml	Sigma
1% Penicillin	5 ml	Biochrom
1% Glutamin	5 ml	Biochrom
0,1% Dexamethason	500 µl	Sigma
0,1% Glutagon	500 µl	Calbiochem
0,1% Insulin	500 µl	Calbiochem
- PBS		Biochrom
- Trypsin		Biochrom
- Trypanblau		Biochrom
- DMSO (Dimethylsulfoxid)		Sigma
- Bisphenol A		Aldrich

3.1.2 Methode

Um Zellen in neue Zellkulturplatten aussähen und für die Versuche verwenden zu können, mussten diese von einer Zellkulturflasche (BD Falcon), die zum Vermehren von Zellen verwendet wird, gelöst werden. Dieser Vorgang wird als Trypsinieren bezeichnet. Hierzu wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt. Anschließend wurde mit PBS gespült, wobei für kleine Zellkulturflaschen eine Mengen von ca. 2,5ml, für mittlere 5ml und für große 10ml nötig waren. Das PBS wurde im Anschluss wieder abgesaugt und Trypsin

entsprechend der Zellkulturflaschengröße hinzu pipettiert (1,25/2,5/5ml). Für ca. 5-7 min kamen die Flaschen bei 37°C in den Brutschrank zum Inkubieren. Nach dieser Zeit wurde die Zellablösung unter dem Mikroskop beobachtet. Waren die Zellen noch nicht vollständig abgelöst, musste für weitere Minuten (1-2min) inkubiert werden. Waren die Zellen jedoch gut abgelöst, wurde die Reaktion durch das Hinzupipettieren der 4fachen Menge an Medium gestoppt. Die Lösung wurde dann in ein Falcon-Röhrchen überführt und bei 1800 rcf für 5 min zentrifugiert. Den entstandene Überstand saugte man anschließend ab und resuspendierte das Pellet in 1ml Medium. Nun mussten die Zellen gezählt werden, um die Menge an Zellsuspension zu berechnen, die erforderlich war, um die gewünschte Zellzahl zum Aussähen zu bekommen. Die Zellzahlbestimmung erfolgte hier mit einer Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden 10µl der Zellsuspension mit 90µl Trypanblau vermischt. Von dieser Lösung wurden wiederum 10µl auf eine Seite der Neubauer-Zählkammer pipettiert und die nicht-blau gefärbten Zellen in allen 4 B-Quadraten gezählt. Die Zellzahl insgesamt wurde nun aus dem Durchschnittswert der 4 B-Quadrate multipliziert mit 10^5 berechnet. Bei anderen Verdünnungen und Resuspensionsvolumen musste die Berechnung angepasst werden. Die benötigte Menge an Zellsuspension wird wie folgt berechnet: $\frac{\text{gewünschte Zellzahl}}{\text{gezählte Zellzahl}} \text{ ml}$. Die

restliche Zellsuspension konnte dann zum erneuten Aussähen auf Zellkulturflaschen zur weiteren Vermehren verwendet oder weggefroren werden. Die Kryokonservierung erfolgte im Verhältnis 70% Medium mit Zellen, 20% FCS und 10% DMSO.

Bei diesen Versuchen wurden zum Aussähen der Zellen, die für den Versuch mit Bisphenol A verwendet wurden, 24- und 6-well-plates (Falcon), sowie 24- und 6-well-Bioreaktoren (Abbildung 8) und „bottom plaques“ verwendet.



Abbildung 8: 6-well-Bioreaktor [Giri et al, 2010]

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 50.000 (bei 24 Wells)/1.000.000 (bei 6 Wells)/20.000 (bei „bottom plaques“) Zellen pro Well und in einem Volumen von 500 µl/1 ml/800 µl pro Well ausgesät. Die Hälfte der Well-Platten und die Bioreaktoren, sowie die Hälfte der „bottom plaques“ wurden vor dem Aussähen noch mit dem Nanogel Pura beschichtet, um eine 3D-Kultivierung zu realisieren. Hierzu musste dieses von 100% auf 1% mit sterilem Wasser verdünnt werden. Auf die 6-well-plates/-Bioreaktoren wurden 1200 µl 1%iges Pura pipettiert, auf die 24-well-plates/-Bioreaktoren 300 µl und auf die „bottom plaques“ 800 µl. Anschließend wurde 2x die gleiche Menge an Medium hinzupipettiert und zwar indem man die Pipettenspitze an den Rand hielt und das Medium ganz langsam hinzugab. Das Ganze kam für 1 Stunde bei 37°C in den Inkubator. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und neues Medium hinzugegeben (2 ml/500 µl/2 ml). Anschließend wurde alles erneut für mindestens 2 Stunden in dem Brutschrank bei 37°C inkubiert, konnte aber auch für mehrere Tage dort gelagert werden. Das Medium hatte hier die Funktion, das saure Milieu des Nanogels zu neutralisieren. Im Anschluss waren die Platten bereit zum Aussähen der Zellen. Die Zellen wurden ca. einen Tag lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Bisphenol A-Konzentrationen versetzt. Dabei wurden Konzentrationen von 1µM, 10µM, 20µM, 40µM, 60µM, 80µM, 100µM, 200µM, 400µM, 600µM, 800µM, 1mM und Kontrollen (ohne Zusatz von Bisphenol A) für das live/dead-Assay, den MTT-Test und den LDH-Test verwendet, für die restlichen Versuche Konzentrationen von 20µM, 40µM, 100µM und ebenfalls Kontrollen. Als Ausgangslösung diente eine 10mM-Bisphenol A-Lösung, die eine Konzentration von 2,28 mg/ml besaß.

3.2 Live/dead-Assay

3.2.1 Material

- Calcein	Biotium
- Ethidium	Biotium
- PBS	Biochrom

3.2.2 Methode

Bei dem live/dead-Assay werden lebende (grün) und tote (rot) Zellen gefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Es wurde nach 24h und 48h der Zugabe von Bisphenol A durchgeführt. Dafür wurde in den entsprechenden Wells das Medium abgesaugt und 2x mit PBS gewaschen. Bei diesen Versuchen wurden 4 Wells mit unterschiedlichen Bisphenol A-Konzentrationen pro Versuch ausgewählt. Für die Färbung wurden Calcein (für lebende Zellen) und Ethidium (für tote Zellen) benötigt, welche man 1:1000 mit PBS verdünnte. Für 1ml Lösung brauchte man also 1µl Calcein, 1µl Ethidium und 998µl PBS. Bei einer 24-well-plate wurden 250µl dieser Lösung auf die gewaschenen Wells pipettiert. Die Platten wurden dann ca. 10-15 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert werden. Anschließend konnten die gefärbten Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

3.3 MTT-Test

3.3.1 Material

- PBS		Biochrom
- MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazoliumbromid)		Sigma
- Medium für RLC-18-Zellen (siehe „Kultivierung“)		
- Lysis-Lösung		
DMSO	99,4ml	Sigma
HCl	0,6ml	Roth
SDS (Natriumdodecylsulfat)	10g	Sigma

3.3.2 Methode

Für den MTT-Test musste das Medium abgenommen werden. Dies wurde jedoch nicht verworfen, sondern für den LDH-Test in Tubes aufgehoben. Dabei war es wichtig, dass die Lösungen einer Konzentration von Bisphenol A in jeweils ein Tube kamen. Diese konnten maximal für einen Tag bei 4°C gelagert werden. Im Anschluss wurden die Wells 1x mit PBS gewaschen und dieses wieder entfernt. Für den MTT-Test wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 5mg MTT in 1ml PBS, welche filtriert wurde, benötigt. Diese MTT-Lösung verdünnte man anschließend 1:10 mit Medium. Für die 24-well-plate war ein

Volumen von 300µl/Well erforderlich. Die Platten inkubierte man anschließend bei 37°C für eine Stunde im Brutschrank. Nach dieser Stunde kamen 300µl Lysis-Solution pro Well hinzu. Die Platten wurden nun in einem Thermoschüttler für 10 min bei 70°C und 700rpm inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Messung der optischen Dichte im Plattenreader (TECAN Safire) bei einer Messungswellenlänge von 570nm, einer Referenzwellenlänge von 630nm, einer Temperatur von 25°C und einer Schütteldauer von 5s vor jeder Messung. Nach der Messung wurden die Lösungen in den Wells ordnungsgemäß im Chemikalienbehälter entsorgt.

3.4 LDH-Test

3.4.1 Material

- 50mM Kaliumphosphatpuffer (KPP), pH 7,5

K ₂ HPO ₄	870mg/100ml H ₂ O	Roth
---------------------------------	------------------------------	------

KH ₂ PO ₄	680mg/100ml H ₂ O	Roth
---------------------------------	------------------------------	------

- Pyruvat-Lösung

Natrium-Pyruvat	110mg/ml KPP	Sigma
-----------------	--------------	-------

- noch 1:11 mit KPP weiter verdünnen

- NADH-Lösung

NADH-Disodium Salt	10mg/ml KPP	Roche
--------------------	-------------	-------

- Reaktionslösung

KPP	10ml
-----	------

NADH-Lösung	297µl
-------------	-------

Pyruvat-Lösung	187µl
----------------	-------

3.4.2 Methode

Für den LDH-Test benötigte man eine Reaktionslösung, die vor jedem Test frisch hergestellt werden sollte. Weiterhin musste eine Methode für den Plattenreader (TECAN Safire) eingerichtet werden. Die Messung erfolgte bei 340nm mit 40 Zyklen und aller 60s eine Messung. Der Temperaturbereich lag zwischen 24°C und 28°C und die Platten mussten schnell geschüttelt werden. Des Weiteren sollten die zu messenden Wells definiert werden. Nun wurde auf eine 96-well-plate (Falcon) in die definierten Wells 200µl der Reaktionslösung vorgelegt. Anschließend wurden die Medium-Bisphenol-A-Lösungen, welche während des MTT-Tests aufgehoben wurden, benötigt. Es wurden 50µl jeder Probe in

ein Well auf die Reaktionslösung pipettiert und so schnell wie möglich die Messung gestartet, da die Reaktion sofort begann. Für den Verlauf der Reaktion war es wichtig zu beobachten, ob es zu einem gleichmäßigen linearen Abfall der Messwerte kam. Wenn dies nicht der Fall war, hat die Reaktion den steady state bereits erreicht und die Probe musste verdünnt werden.

3.5 Konfokalmikroskopie

3.5.1 Material

- Medium für RLC-18 (siehe „Kultivierung“)
- Mitochondrienmarker Mitotracker Deep Red 633 Molecular Probes

3.5.2 Methode

Hierfür wurden die Zellen auf „bottom plaques“ kultiviert (siehe „Kultivierung“). Bisphenol A wurde in folgenden Konzentrationen auf die Zellen gegeben: 60µM, 200µM und eine Kontrolle. Die geschah auf normalen „bottom plaques“ und auf welchen, die mit Nanogel präpariert wurden. Nach 24h wurden das Medium mit dem Bisphenol A entfernt. Der Marker für die Mitochondrien wurde 1:1000 mit Medium verdünnt. Davon wurden 800µl auf jedes „bottom plaque“ pipettiert und 15 min bei 37°C inkubiert. Danach betrachtete man die gefärbten Mitochondrien unter einem Konfokalmikroskop, um Schädigung beobachten zu können.

3.6 Protein- und RNA-Isolierung

3.6.1 Material

- peqGOLD TriFast peqlab
- Chloroform Roth
- Isopropanol Roth
- Ethanol Roth
- 0,3M Guanidinhydrochlorid in 95% Ethanol Roth
- 1% SDS Sigma

3.6.2 Methode

Proteine und RNA wurden spätestens 24h nach der Zugabe von Bisphenol A isoliert. Hierzu wurde das Medium entfernt und auf jedes Well einer 6-well-plate 500µl TriFast unter einem Abzug pipettiert. Mit einem Zellschaber wurde die Lyse der Zellen unterstützt. Nach 2-3 minütigem Schaben wurden die Lösungen in Tubes pipettiert. Dabei war zu beachten, dass jedes Well in ein extra Tube überführt wurde. Je eingesetztem ml TriFast wurden im Anschluss 0,2ml Chloroform in die Tubes hinzu gegeben, kräftig geschüttelt und für 3-10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 12.000g und 4°C zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erhalten. Es bildeten sich dabei 3 Phasen aus: eine untere rote TriFast-Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. Die RNA war ausschließlich in der wässrigen Phase angereichert, während sich die Proteine und die DNA in der Interphase und der TriFast-Phase befanden.

Die wässrigen Phasen der Proben wurden in neue Tubes überführt und die Interphase und die TriFast-Phase bis zur Proteinaufreinigung im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Die Präzipitation der RNA erfolgte mit 0,5ml Isopropanol pro eingesetzten ml TriFast. Die Proben mischte man und lagerte sie für 5-15 min auf Eis oder bei 4°C. Im Anschluss zentrifugierte man die Proben für 10 min bei 12.000g und 4°C. Danach wurde der Isopropanolüberstand vorsichtig abgenommen und das entstandene Pellet zweimal mit 1ml 75% Ethanol durch Vortexen und anschließende Zentrifugation (10 min, 12.000g, 4°C) gewaschen. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet lassen. Ein vollständiges Trocknen sollte jedoch vermieden werden, da sonst die Löslichkeit der RNA sich verschlechterte. Die RNA sollte auf keinen Fall durch Vakuumzentrifugation getrocknet werden. Die getrocknete RNA wurde in 30µl DEPC-Wasser aufgenommen und durch mehrmaliges Auf- und Abziehen der Pipette gelöst. Ein Erhitzen für 10 min bei 55-60°C verbesserte die Löslichkeit. Danach wurde die Konzentration der RNA mit dem NanoDrop von Thermo bestimmt. Die RNA konnte im Anschluss weiter verwendet werden für die cDNA-Synthese oder man lagerte sie bei -70°C.

Nun erfolgte die Aufreinigung der Proteine. Auf die Röhrchen mit der Interphase und der TriFast-Phase wurden 0,3ml 100% Ethanol pro eingesetzten ml TriFast pipettiert. Dies diente zum Fällern der DNA. Die Proben wurden gut durchmischt und 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend pelletierte man die DNA durch ein Zentrifugationsschritt (2.000g, 15 min, 4°C). Der Ethanol/TriFast-Phase wurde abpipettiert und in neue Tubes überführt, um

weiter verwendet werden zu können. Die Proteine wurden durch die Zugabe von 1,5 ml Isopropanol präzipitiert. Die Proben wurden nicht geschüttelt. Sie inkubierte man für 10 min bei Raumtemperatur und anschließend zentrifugierte man für 10 min bei 12.000g und 4°C. Der Überstand wurde entfernt und das Proteinpellet mit 2ml 0,3M Guanidinhydrochlorid gewaschen. Hierfür inkubierte man die Proben jeweils für 20 min bei Raumtemperatur und zentrifugierte sie anschließend für 5 min bei 7.500g und 4°C. Das Proteinpellet konnte nach diesem Schritt in Guanidinhydrochlorid bei -20°C weggefroren werden. Danach vortexte man die Proteinpellets in jeweils 2ml 100% Ethanol, inkubierte sie für 20 min bei Raumtemperatur und zentrifugierte alles erneut (5 min, 7.500g, 4°C). Das Ethanol entfernte man dann vollständig und trocknete das Proteinpellet bei ca. 50°C in einer Vakuumzentrifuge. Im Anschluss wurden die Pellets in 1% SDS gelöst. Um die Pellets vollständig zu lösen, war eine Inkubation bei 50-100°C für ca. 5 min nützlich. Das Pellet bestand aus löslichen Proteinen und unlöslichen Bestandteilen, wie Membranresten und extrazellulärem Material, die durch eine Zentrifugation für 10 min bei 10.000g und 4°C entfernt werden konnten. Der Proteinüberstand wurde in ein neues Röhrchen überführt, wobei hier Proben, die auf dieselbe Art und Weise kultiviert wurden, zusammengeführt werden konnten, um die Konzentration zu steigern. Die Bestimmung der Konzentration wird im Punkt „Proteinkonzentrationsbestimmung“ erläutert. Die Proteinlösungen konnten darauf sofort weiter verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

3.7 Proteinkonzentrationsbestimmung

3.7.1 Material

Pierce BCA Protein Assay Kit

Thermo Scientific

- BCA Reagent A

- BCA Reagent B

- Albumin Standard (2 mg/ml)

SDS

Sigma

3.7.2 Methode

Um eine Konzentrationsbestimmung bei Proteinen durchführen zu können, musste zunächst eine Standardreihe hergestellt werden. Dies geschah mit dem Albumin Standard. Als Lösungsmittel diente 1% SDS, da die Proteine ebenfalls darin gelöst wurden. Bei einem anderen Lösungsmittel muss das entsprechende verwendet werden. Die Standardreihe wurde nach folgender Tabelle pipettiert.

Tabelle 3: Standardreihe für BCA

Lösung	Volumen des Lösungsmittels	Volumen und Quelle von Albumin	Konzentration von Albumin
A	0 µl	300 µl Stock-Solution	2 mg/ml
B	125 µl	375 µl Stock-Solution	1,5 mg/ml
C	325 µl	325 µl Stock-Solution	1 mg/ml
D	175 µl	175 µl aus Lösung B	0,75 mg/ml
E	325 µl	325 µl aus Lösung C	0,5 mg/ml
F	325 µl	325 µl aus Lösung E	0,25 mg/ml
G	325 µl	325 µl aus Lösung F	0,125 mg/ml
H	400 µl	100 µl aus Lösung G	0,025 mg/ml
I	400 µl	0 µl	0 mg/ml

Als nächstes wurde eine Arbeitslösung aus dem BCA Reagent A und dem BCA Reagent B benötigt. Pro Probe wurden 200µl benötigt und für jede Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt. Das notwendige Volumen wurde daher wie folgt bestimmt:

$(\text{Anzahl der Standards} + \text{Anzahl der Proben}) \cdot 2 \cdot 200\mu\text{l} = \text{benötigtes Gesamtvolumen.}$

Für die Arbeitslösung wurden die Reagenzien A und B im Verhältnis 1:50 gemischt und gut gevortext (50 Teile A und 1 Teil B). Anschließend wurden 25µl Probe bzw. Standard in eine 96-well-plate pipettiert, jeweils 200µl der Arbeitslösung hinzu gegeben, für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur herunter gekühlt. Danach erfolge eine Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 562nm. Mit den Werten der Standardlösungen wurde eine Standardkurve erstellt und damit die Konzentrationen mittels der gemessenen Werte für die Proteine bestimmt. Die Standardproben wurden bei -20°C eingefroren und konnten für weitere Messung wiederverwendet werden.

3.8 cDNA-Synthese

3.8.1 Material

- FastLane Cell cDNA Kit (50)

Quiagen

gDNA Wipeout Buffer

RNase-free water

Quantiscript Reverse Transcriptase

Quantiscript RT Buffer

RT Primer Mix

- Proben aus RNA-Isolierung

3.8.2 Methode

Zunächst wurden alle Materialien aufgetaut und auf Eis gelagert. Der erste Schritt bestand in der Eliminierungsreaktion der genomischen DNA. Die Reagenzien wurden nach Tabelle 4 pipettiert. Das Volumen der Probe musste entsprechend der bestimmten RNA-Konzentration errechnet werden, dass pro Ansatz 1 µg RNA enthalten waren.

Tabelle 4: Komponenten für die Eliminierungsreaktion genomischer DNA

Komponente	Volumen
gDNA Wipeout Buffer	2 µl
Probe aus RNA-Isolierung	1 µg RNA
RNase-free water	variabel
Gesamtvolumen	14 µl

Anschließend wurde das Ganze für 5 min bei 42 °C im Thermoblock inkubiert und danach auf Eis gelagert. Nun wurde der Reverse Transkriptase - MasterMix nach Tabelle 5 auf Eis hergestellt.

Tabelle 5: Komponenten für die cDNA-Synthese

Komponente	Volumen
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl
Quantiscript RT Buffer	4 µl
RT Primer Mix	1 µl

Die Komponenten wurden mit der entsprechenden Probenanzahl multipliziert. Anschließend wurden 6 µl des MasterMixes auf Eis vorgelegt und zu jedem Ansatz 14 µl der Proben hinzupipettiert, sodass das Endvolumen 20 µl betrag. Das Ganze wurde für 30 min bei 42 °C und anschließend 3 min bei 95 °C im Thermoblock inkubiert und konnte danach gleich für die PCR weiter verwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

3.9 Semiquantitative PCR

3.9.1 Material

- dNTPs (jeweils 2mM)		Promega
- Primer		
Cyp2E1		Applied Biosystems
Cyp1A2		Operon
Fmo1		Applied Biosystems
GAPDH		Operon
- 6x Loading Dye		Fermentas
- Taq-Polymerase		Qiagen
- 10x PCR-Puffer mit 15mM MgCL ₂		Qiagen
- 25 mM MgCl ₂		Qiagen
- Braun-Wasser		Qiagen
- TBE-Puffer (V = 1l)		
0,89M Tris	108g	Roth
0,89M Borsäure	55g	Roth
EDTA	7,4g	Fluka
auf 1l mit dest. Wasser auffüllen		

- Agarose	Sigma
- Sybr Safe	Invitrogen
- Gen Ruler DNA Ladder Mix, ready-to-use	Fermentas

3.9.2 Methode

Für die PCR benötigt man pro Probe einen 10µl-Ansatz. Dieser besteht aus folgenden Materialien in den entsprechenden Mengen:

- 1µl 10x PCR-Puffer
- 1µl dNTPs
- 0,4µl Primer fwd oder - 0,8µl Primer-Mix
- 0,4µl Primer rev
- 0,4 µl MgC l₂
- 1µl cDNA
- 5,75µl Braun-Wasser
- 0,05µl taq-Polymerase

Das Ganze wurde in PCR-Tubes pipettiert und den Thermocycler gestellt. Dort wurden die entsprechenden Temperaturen, Zyklen und Zeiten eingestellt:

- Deckeltemperatur 110°C
- Initiale Denaturierung 95°C 5min
- 40 Zyklen
 - Denaturierung 95°C 30s
 - Annealing individuell 30s
 - Elongation 72°C 30s
- Finale Elongation 72°C 5min
- Lagerung 4°C 9h
- Lagerung 4°C 9h
- Ende

Für die Primer mussten individuelle Annealing-Temperaturen eingestellt werden:

- GAPDH 60°C
- Cyp2E1 60°C
- Cyp1A2 60°C
- Fmo1 57°C

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1-2%iges Agarosegel mit TBE-Puffer hergestellt. In dieses wurde 1:10.000 verdünnt Sybr Safe hinzupipettiert. Die Lösung wurde in der Mikrowelle erhitzt, wobei man auf den Siedeverzug achten musste. Es wurde so lange erhitzt, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Anschließend wurde das Gel in eine Gießkammer mit Kamm gegossen und ausgekühlt lassen. Danach wurde die Kämme entfernt, die Kammer mit dem Gel in die Laufkammer gestellt und alles mit TBE-Puffer aufgegegossen, bis das Gel damit bedeckt war. Zu den Proben aus der PCR wurden jeweils 2µl 6x Loading Dye hinzupipettiert und 10µl der Proben in die Taschen pipettiert. Von dem Marker wurden jeweils links und rechts der aufgetragenen Proben 5µl in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese lief bei 100V für ca. 1-1,5h. Zum Schluss wurde ein Bild der Gele unter UV-Licht gemacht.

3.10 Western Blot

3.10.1 Material

- 1 M Tris/HCl pH 6,8/8,0/8,8	60,57 g in 500 ml dest. Wasser, mit HCl pH-Wert einstellen	
- 10 % APS		
Ammoniumpersulfat	100 mg	BioRad
destilliertes Wasser	1 ml	
- Trenngel (10%):		
destilliertes Wasser	2,5 ml	
Acrylamid (30%)	2 ml	AppliChem
4x Tris-SDS (pH 8,8)	1,5 ml	Sigma
10 % APS	60 µl	Roth
TEMED	6 µl	Roth
- Ladungsgel (6%):		
destilliertes Wasser	1,35 ml	
Acrylamid (30%)	0,5 ml	AppliChem
4x Tris-SDS (pH 6,8)	625 µl	Sigma
10 % APS	25 µl	Roth
TEMED	2,5 µl	Roth

- 10x SDS-Laufpuffer (V = 1 l)

250 mM Tris	30 g	Roth
1,92 M Glycin	144 g	AppliChem
1% SDS	10 g	Fluka

für Versuche auf 1x herunterverdünnen

- Transferpuffer (V = 2 l)

0,025 % SDS	0,5 g	Fluka
39 mM Glycin	5,8 g	AppliChem
48 mM Tris	11,6 g	Roth

- 10x TBS-Puffer (V = 1 l)

100 mM Tris/HCl pH 8,0	100 ml 1 M Tris/HCl pH 8,0	
1,5 M NaCl	87,75 g	Roth

- 1x TBS-T-Puffer (V = 1 l)

10x TBS-Puffer	100 ml	
destilliertes Wasser	900 ml	
Tween 20	500 µl	Sigma

- Blocking-Lösung (V = 500 ml)

5% Milchpulver	25 g	Roth
1x TBS-T-Puffer	500 ml	

- 6x Loading Dye Solution

Fermentas

- Coomassie

Coomassie G 250	2 g	Fluka
destilliertes Wasser	100 ml	

- Ponceau S

Roth

- Marker Fermentas prestrained 0671

Fermentas

- Gießapparatur (Spacer 0,75 mm)

BioRad

- Elektrophoresekammer, Blotkammer, Füllschwämme,

Blothalterung

BioRad

- Membran

CellSignaling

- Whatmann Filterpapier

Whatmann

- Primerer Antikörper

Monoclonal Anti-Rat Cytochrom P450 (1A1/1A2)

NatuTec

Monoclonal Anti- α -Tubulin Clone B-5-1-2

Sigma

- Sekundärer Antikörper

Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG

Jackson Immuno
Research

- Detektionslösungen: NOWA solution A and B

MoBiTec

- Proben aus Protein-Isolierung

3.10.2 Methode

Gelherstellung:

Zunächst musste die Glasplatten zusammengelegt, mit der Klammer zusammengehalten und in die Gießapparatur geklemmt. Dabei musste drauf geachtet werden, dass die zwei Glasplatten genau gleich abschließen, damit es nicht zum Auslaufen des Gels kam. Anschließend stellte man das Gel für die Elektrophorese her. Dieses bestand aus einem Ladungs- und Trenngel. Zuerst wurde das Trenngel (siehe Material) zusammen pipettiert. Dabei musste drauf geachtet werden, dass das TEMED zuletzt hinzugefügt wurde, da mit der Zugabe dessen die Polymerisation begann. Das gleiche galt auch für das Ladungsgel. Das Trenngel wurde dann ganz langsam zwischen die zwei Glasplatten pipettiert und mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Kante zu erhalten. Das Ganze musste für ca. 40 min polymerisieren. Im Anschluss wurde das Ladungsgel zusammen pipettiert. Das Isopropanol entfernte man mittels eines Filterpapiers, aber ohne dabei das Gel zu berühren. Nun konnte das Ladungsgel auf das Trenngel pipettiert und der Probenkamm eingeführt werden. Das Ganze musste ebenfalls ca. 40 min polymerisieren. Dabei musste immer drauf geachtet werden, dass keine Luftblasen entstanden. Nun konnte der Kamm wieder entfernt und das Gel für die Elektrophorese genutzt bzw. für ein paar Tage feucht bei 4°C gelagert werden.

Probenherstellung:

Für die Elektrophorese wurden etwa 5µg Proteine in 20 µl Gesamtvolumen benötigt. Die notwendige Menge musste mit der errechneten Konzentration bestimmt werden. Das Gesamtvolumen setzte sich aus 16,7 µl Probe und 3,3 µl Laemmli-Puffer zusammen. Konnten die 16,7 µl bei der Berechnung nicht erreicht werden, mussten sie mit destilliertem Wasser aufgefüllt werden. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend 10-45 s herunterzentrifugiert.

Elektrophorese:

Die Glasplatten mit dem Gel dazwischen wurden nun in die Elektrophoresekammer mit der offenen oberen Seite nach innen eingespannt. Anschließend füllte man die Kammer mit Laufpuffer. Dabei wurden zwischen die Platten 125 ml und außen 200 ml gegossen. In die Geltaschen pipettierte man im Anschluss die Proben und den Marker. Nun konnte die Elektrophorese starten, zuerst bei 80V für 10 min und anschließend bei 120V für ca. 1,5 bis 2 Stunden. Zwischendurch sollte kontrolliert werden, dass die Proben nicht aus dem Gel herausliefen.

Blotten:

Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus den Glasplatten entnommen und überstehende Reste sowie das Ladungsgel abgeschnitten. Anschließend wurden das Filterpapier und die Membran auf die Gelgröße zugeschnitten. Das Gel, die Membran und das Filterpapier legte man für 10-20 min bei Raumtemperatur in Transferpuffer. Dabei musste aber beachtet werden, dass die Membran vorher in 50%igem Methanol eingeweicht werden musste, da sonst der Transferpuffer nicht wirken konnte. Die zwei weißen Füllschwämme wurden in Laufpuffer eingeweicht. Nun wurde der Blot wie folgt zusammengesetzt:

- dunkle Seite der Blothalterung
- weißer Füllschwamm
- Whatmann Filterpapier
- Gel
- Membran
- Whatmann Filterpapier
- weißer Füllschwamm
- helle Seite der Blothalterung

Der Einsatz kam in die Blotkammer, wo bei sie so eingehängt wurde, das die dunkle zur dunklen Seite der Kammer und die helle zur roten Seite der Kammer zeigte. Nun lief das Ganze bei 100V für 1-1,5 Stunden. Nach dem Blotten wurde das Gel 5-10 min mit der Coomassie-Lösung gefärbt, um zu überprüfen, ob noch Proteine auf dem Gel sind. Die Membran wurde 5-10 min mit PonceauS-Lösung gefärbt, um die Proteine sichtbar zu machen, und anschließend in Wasser entfärbt. Dies geschah alles auf einem Wipptisch. Danach wurde das Gel ordnungsgemäß entsorgt und von der Membran ein Foto unter UV-Licht gemacht.

Antikörperfärbung:

Um die gesuchten Proteine identifizieren zu können, mussten sie mit Antikörpern detektiert werden. Hierfür wurde die Membran zunächst in ca. 20 ml Blocking-Lösung in ein Schälchen für eine Stunde auf den Wipptisch gestellt. Als primäre Antikörper wurden der monoclonal Anti-Rat Cytochrom P450 (1A1/1A2) und der monoclonal Anti- α -Tubulin Clone B-5-1-2 verwendet. Der Cyp1A1/1A2-Antikörper wurde 1:1000 und der α -Tubulin-Antikörper 1:2000 mit Blocking-Lösung verdünnt. Nach dem Blocken wurden diese Lösungen für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben und auf den Wipptisch gestellt. Nach dieser eine Stunde wurde die Membran 3-mal für 5 min mit 1x TBS-T-Puffer auf dem Wipptisch gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde anschließend 1:40.000 ebenfalls in Blocking-Lösung verdünnt und nach dem Waschen für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben und auf den Wipptisch gestellt. Nach dieser Stunde wurde die Membran nochmals 3-mal für 5 min mit 1x TBS-T-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Detektionslösungen aus den Reaktionslösungen A und B hergestellt. Hierfür wurde jeweils 1 ml jeder Lösung zusammen pipettiert und bei 37°C vortemperiert. Die Membran wurde zur Aufnahme in das Chemilumineszenzsystem von BioRad gelegt, die Detektionslösung drauf gegeben und bei der passenden Belichtungszeit ein Bild gemacht.

4 Ergebnisse

4.1 Fotos 24h nach Zugabe von Bisphenol A

24h nach der Zugabe von Bisphenol A zeigten sich durchschnittlich folgende Bilder:

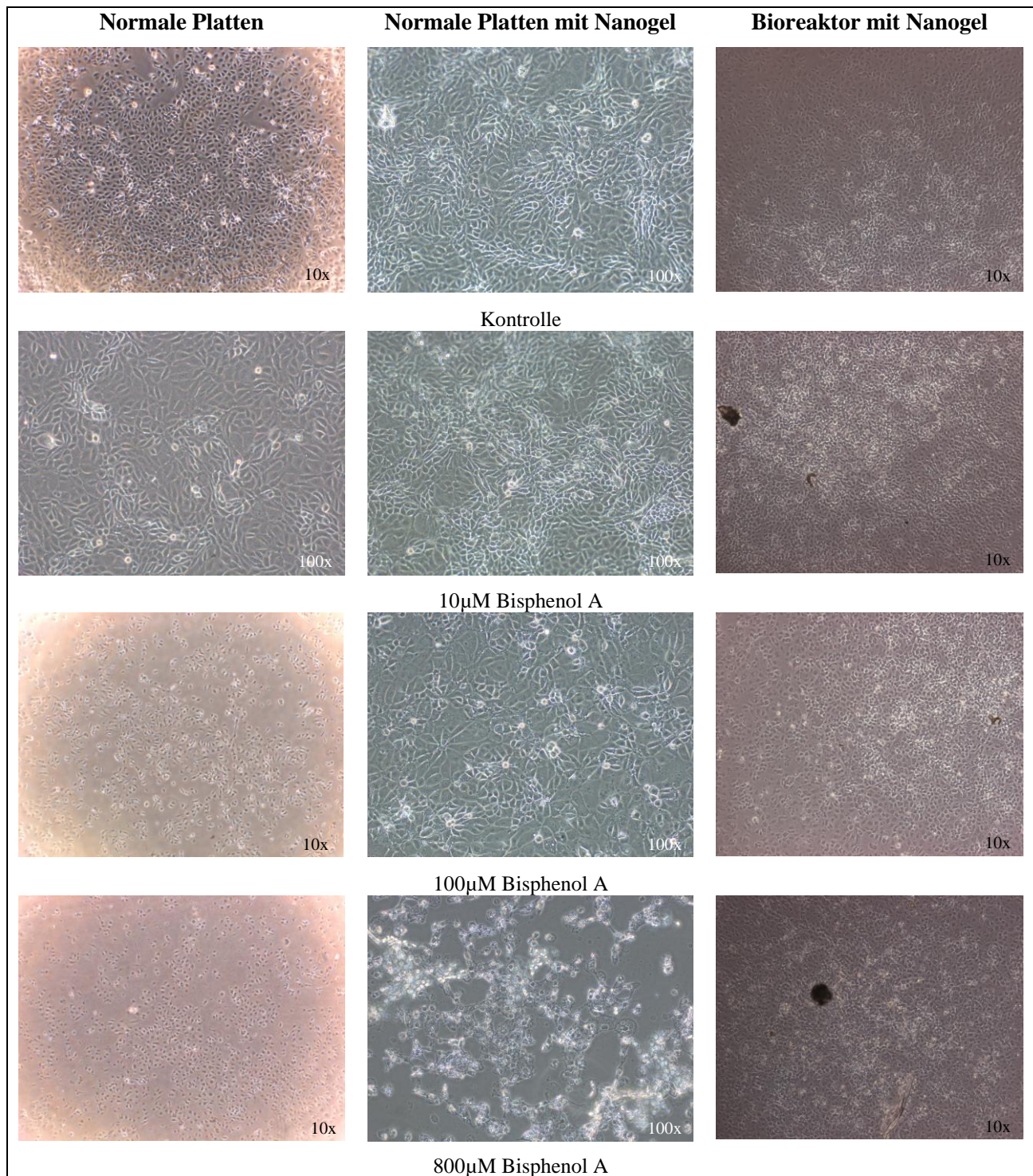


Abbildung 9: Zellen 24h nach Zugabe von Bisphenol A

Alle restlichen Bilder sind im Anhang unter Punkt 1 zu finden.

4.2 Fotos 48h nach Zugabe von Bisphenol A

Nach der Zugabe von Bisphenol A zeigten sich nach 48h durchschnittlich folgende Bilder:

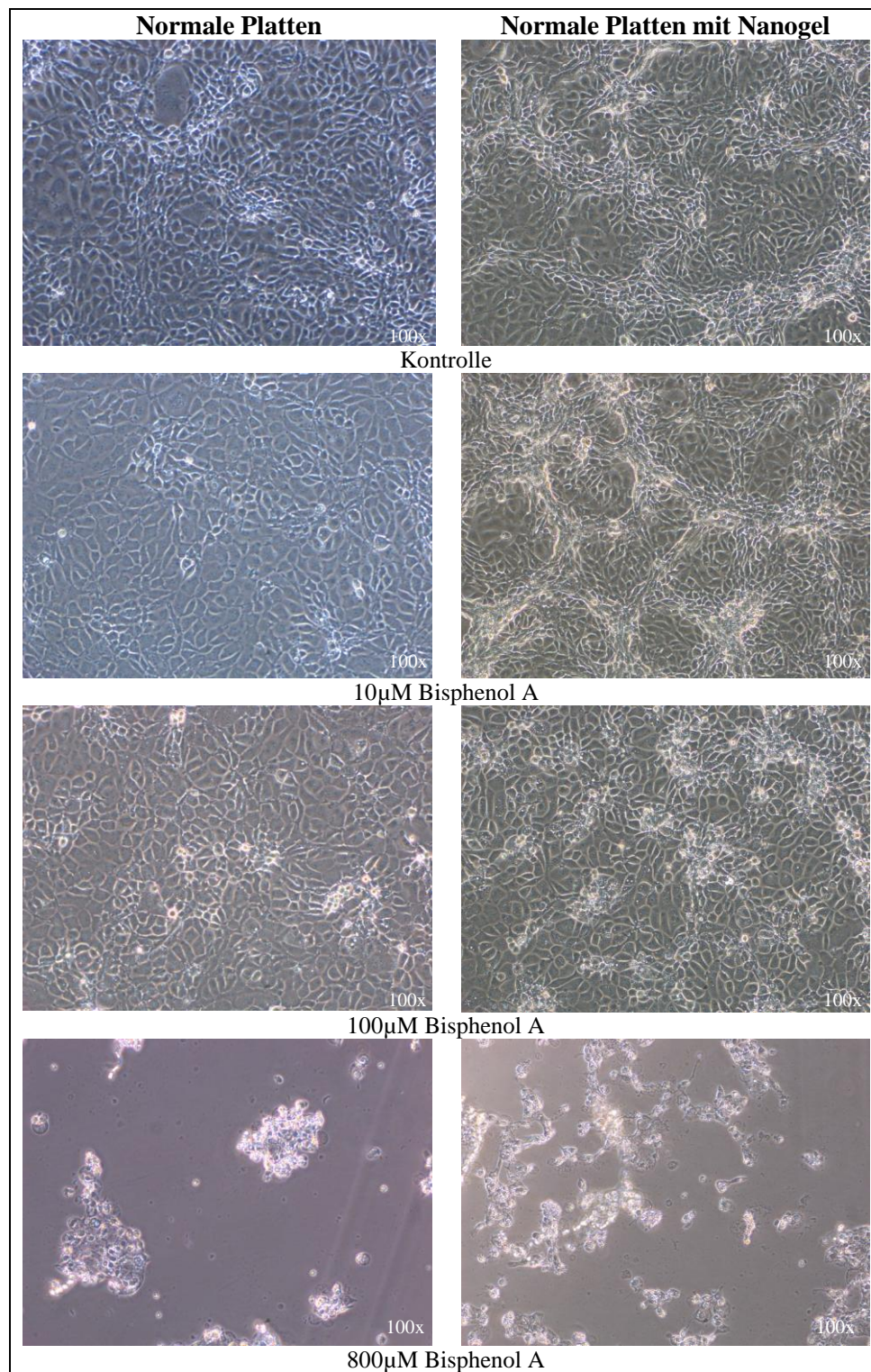


Abbildung 10: Zellen 48h nach Zugabe von Bisphenol A

Die vollständige Aufstellung der Bilder sind ebenfalls im Anhang unter Punkt 2 zu finden.

4.3 Green/Red-Assay 24h nach Zugabe von Bisphenol A

Nach der Zugabe von Bisphenol A zeigten sich nach 24h durchschnittlich folgende Bilder:

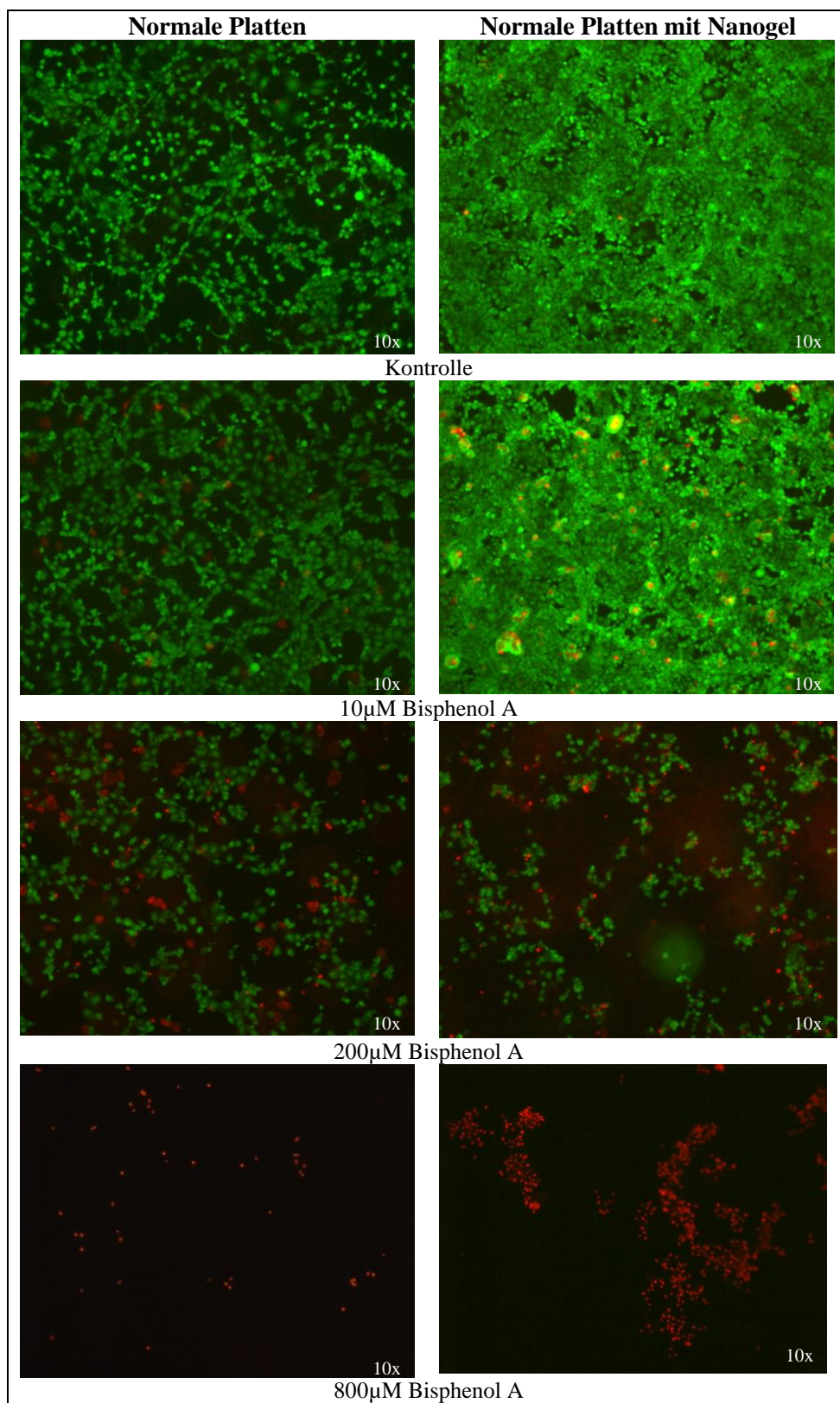


Abbildung 11: durch live/dead-Assay gefärbte Zellen 24h nach Zugabe von Bisphenol A

4.4 Green/Red-Assay 48h nach Zugabe von Bisphenol A

Nach der Zugabe von Bisphenol A zeigten sich nach 48h durchschnittlich folgende Bilder:

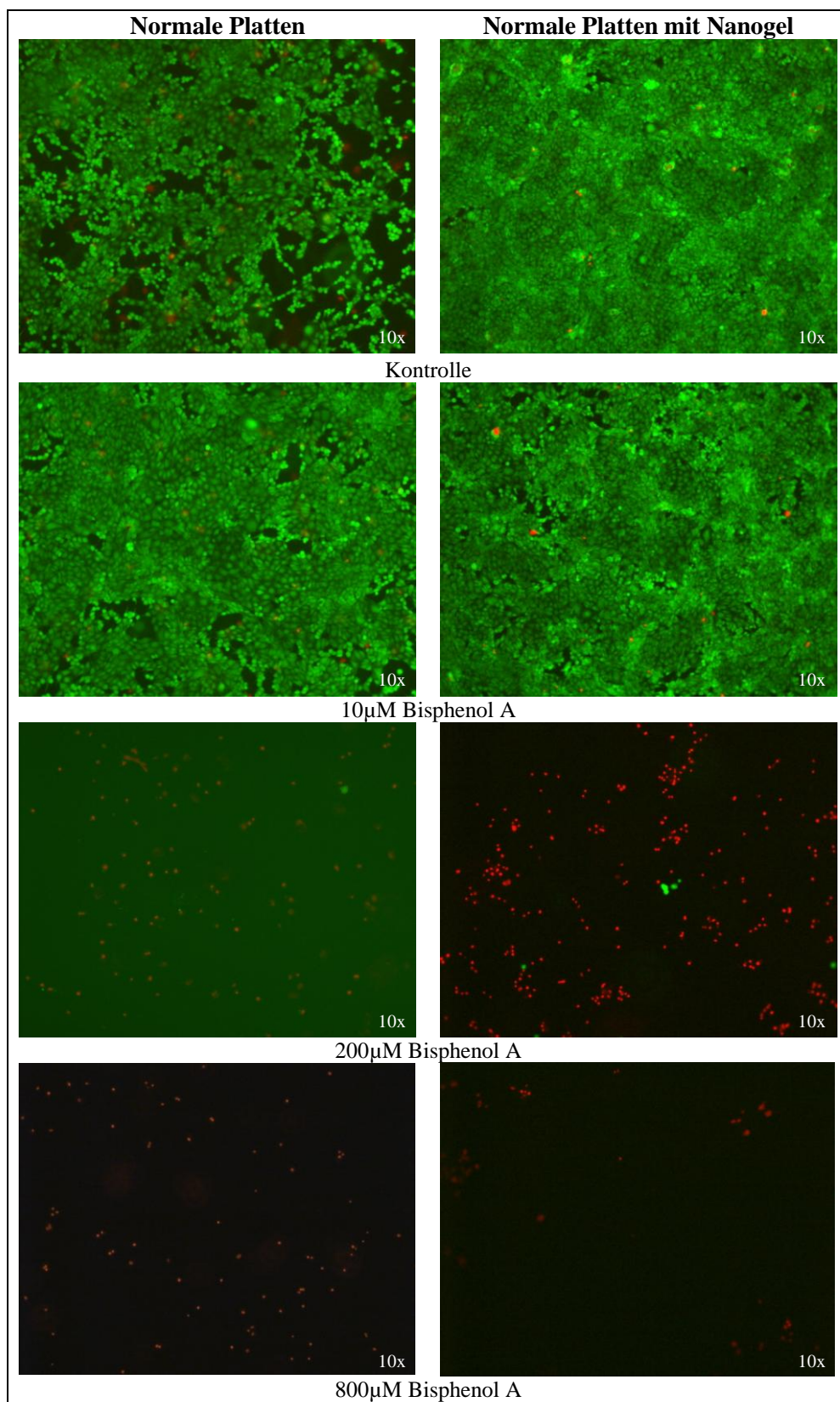


Abbildung 12: durch live/dead-Assay gefärbte Zellen 48h nach Zugabe von Bisphenol A

4.5 MTT-Test

Im Folgenden werden die durchschnittlichen Ergebnisse aus den MTT-Tests 24h und 48h nach Bisphenol A grafisch dargestellt.

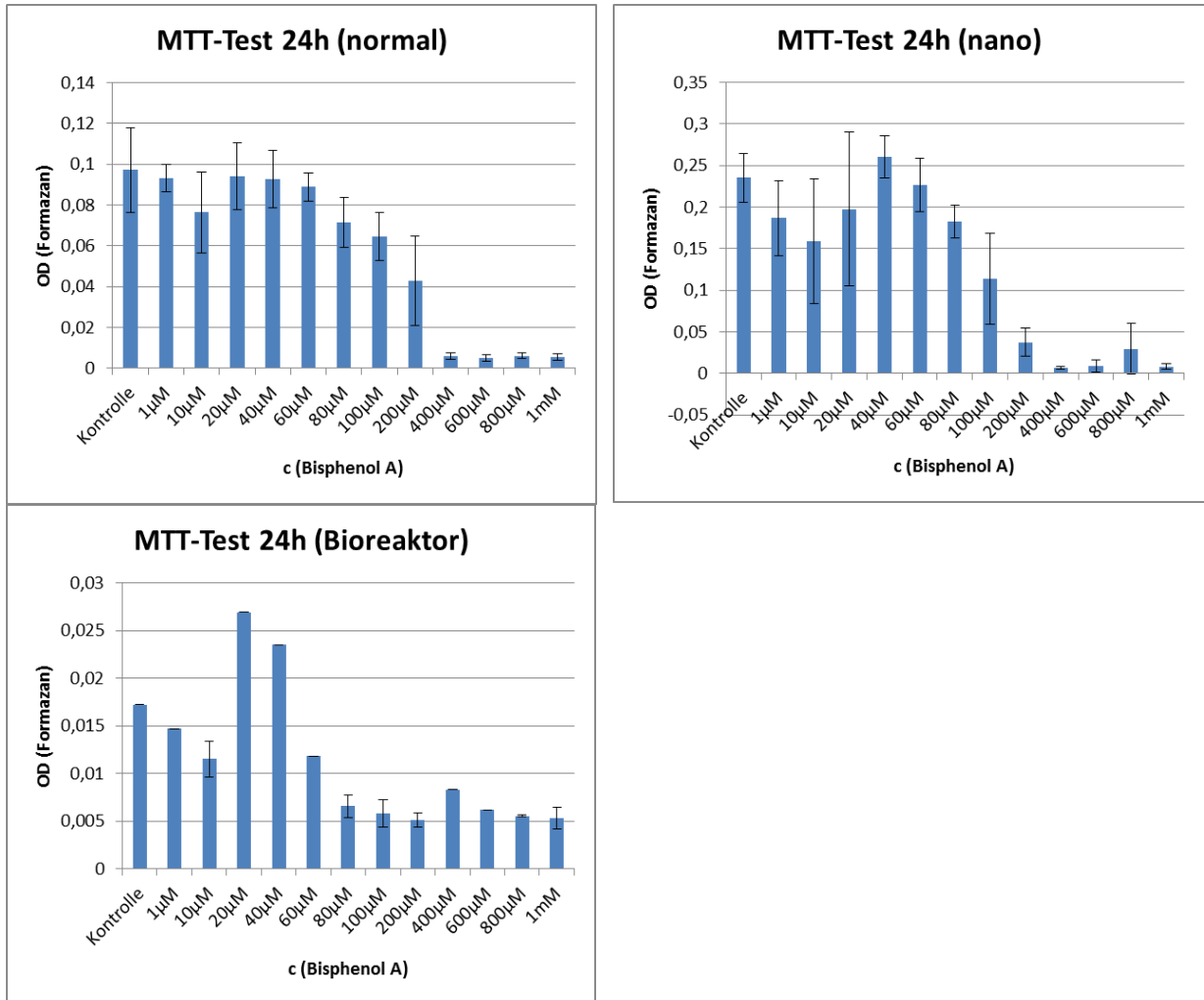


Abbildung 13: grafische Darstellung der Ergebnisse vom MTT-Test 24h nach Zugabe von Bisphenol A

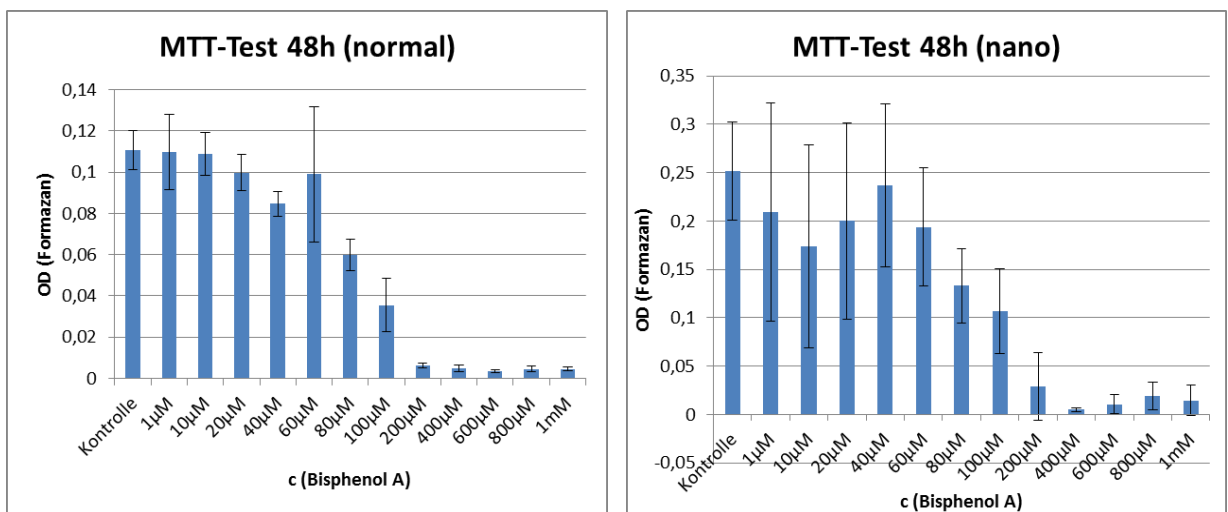


Abbildung 14: grafische Darstellung der Ergebnisse vom MTT-Test 48h nach Zugabe von Bisphenol A

4.6 LDH-Test

Berechnung der LDH-Aktivität (A):

$$A\left[\frac{U}{l}\right] = \left(\frac{\Delta E}{\Delta t[\text{min}]}\right) \times \left(\frac{V_{\text{Test}}[ml]}{V_{\text{Probe}}[ml]}\right) \times \left(\frac{1000}{\varepsilon\left[\frac{l}{\text{mmol} \cdot \text{cm}}\right] \cdot d[\text{cm}]}\right)$$

$$\left(\frac{\Delta E}{\Delta t[\text{min}]}\right) = |m| \quad V_{\text{Probe}} = 0,05ml \quad \varepsilon_{\text{NADH},340nm} = 6,3 \frac{l}{\text{mmol} \cdot \text{cm}}$$

$$V_{\text{Test}} = 0,25ml \quad d = 0,694cm$$

Formel 3: Formel zur Bestimmung der LDH-Aktivität

Die folgenden Tabellen zeigen die berechneten Ergebnisse im Durchschnitt nach 24h und 48h der Zugabe von Bisphenol A.

Tabelle 6: Ergebnisse vom LDH-Test 24h nach Zugabe von Bisphenol A

Konzentration von Bisphenol A	Aktivität A [U/l]		
	<i>Normale Platten</i>	<i>Normale Platten mit Nanogel</i>	<i>Bioreaktor mit Nanogel</i>
Kontrolle	6,86153424	8,0966104	68,6153424
1µM	6,17538082	6,86153424	27,446137
10µM	6,51845753	6,86153424	41,1692054
20µM	6,51845753	6,86153424	41,1692054
40µM	6,86153424	6,86153424	68,6153424
60µM	6,17538082	6,86153424	54,8922739
80µM	6,86153424	6,86153424	61,7538082
100µM	6,86153424	11,4358904	61,7538082
200µM	13,7230685	36,5948493	68,6153424
400µM	27,446137	61,7538082	68,6153424
600µM	27,446137	66,3281643	68,6153424
800µM	27,446137	66,3281643	41,1692054
1mM	27,446137	70,9025205	61,7538082

Tabelle 7: Ergebnisse vom LDH-Test 48h nach Zugabe von Bisphenol A

Konzentration von Bisphenol A	Aktivität A [U/l]	
	<i>Normale Platten</i>	<i>Normale Platten mit Nanogel</i>
Kontrolle	10,2923014	15,0953753
1µM	13,7230685	13,7230685
10µM	10,2923014	13,7230685
20µM	10,2923014	13,7230685
40µM	13,7230685	13,7230685
60µM	13,7230685	13,7230685
80µM	13,7230685	13,7230685
100µM	13,7230685	20,5846027
200µM	27,446137	61,7538082
400µM	27,446137	80,0512328
600µM	27,446137	80,0512328
800µM	24,0153698	73,1896985
1mM	20,5846027	75,4768766

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den Tabellen grafisch dargestellt.

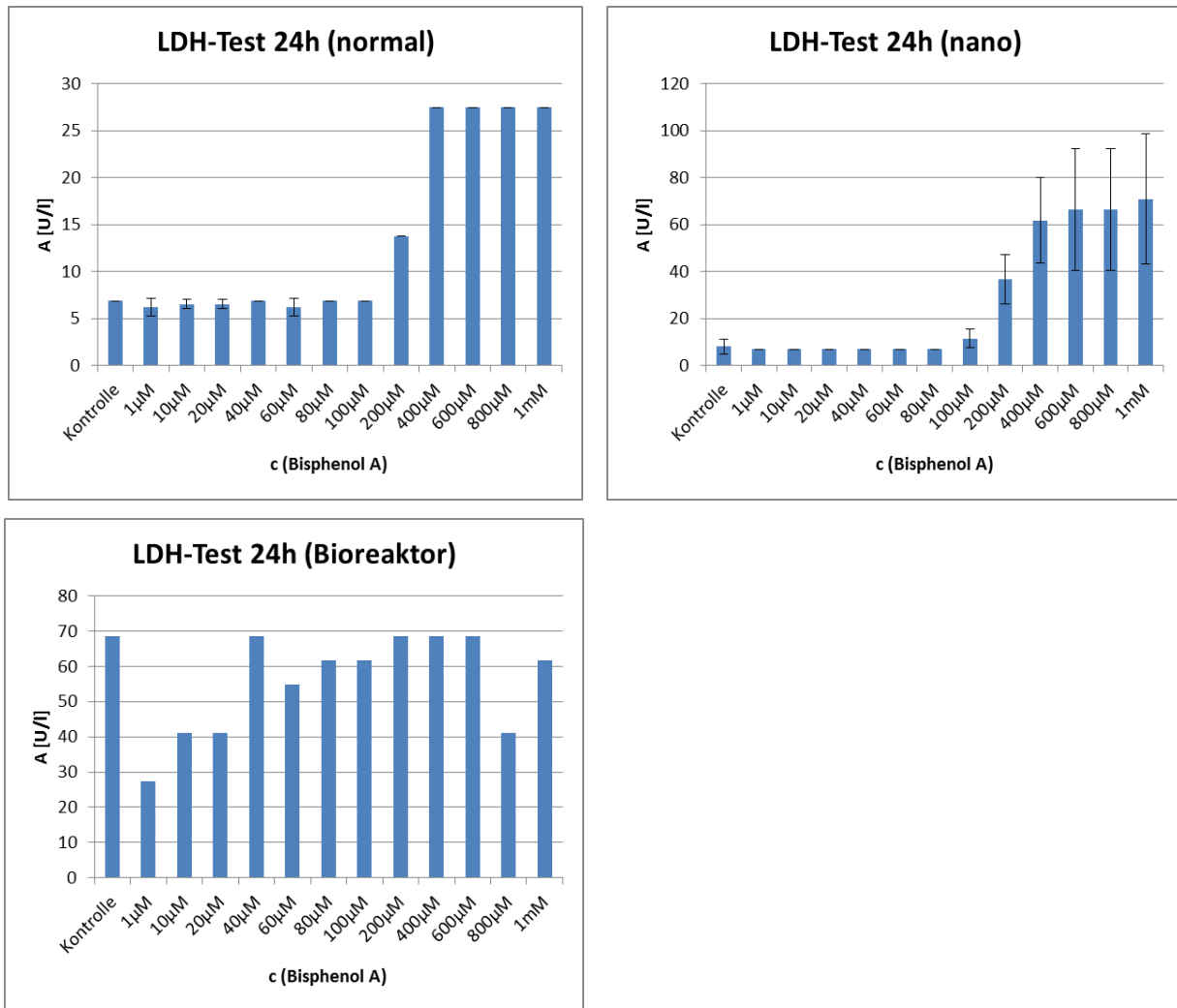


Abbildung 15: grafische Darstellung der Ergebnisse vom LDH-Test 24h nach Zugabe von Bisphenol A

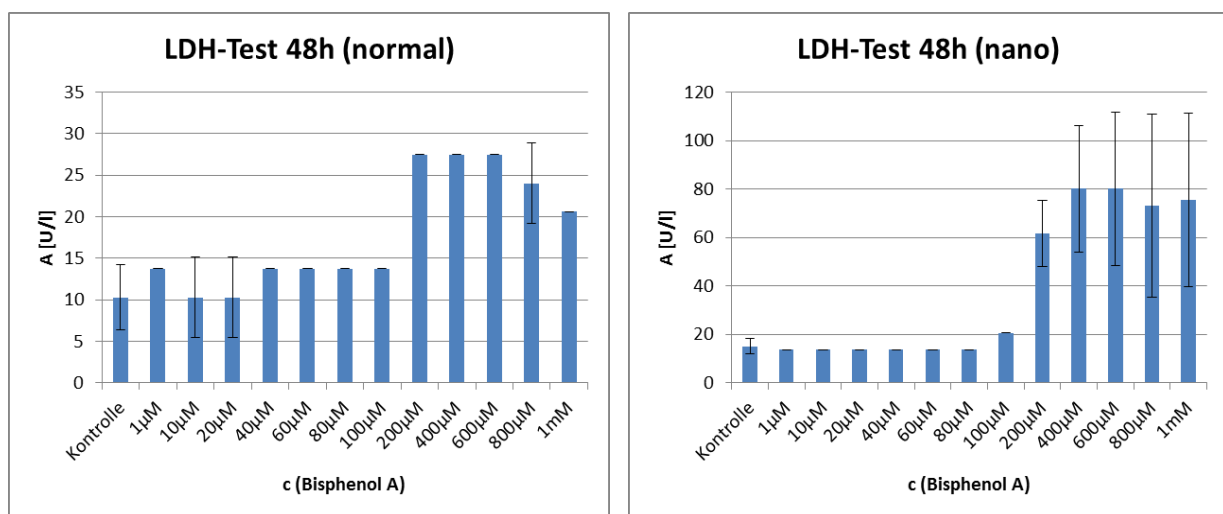


Abbildung 16: grafische Darstellung der Ergebnisse vom LDH-Test 48h nach Zugabe von Bisphenol A

4.7 Konfokalmikroskopie

Nach dem Färben der Zellen mit mitochondrialem Marker zeigten sich unter dem Konfokalmikroskop folgende Bilder. Da bei der Konfokalmikroskopie Fotos von mehreren Schichten gemacht werden, handelt es sich hier um Bilder, bei der alle Schichten übereinander gelegt wurden.

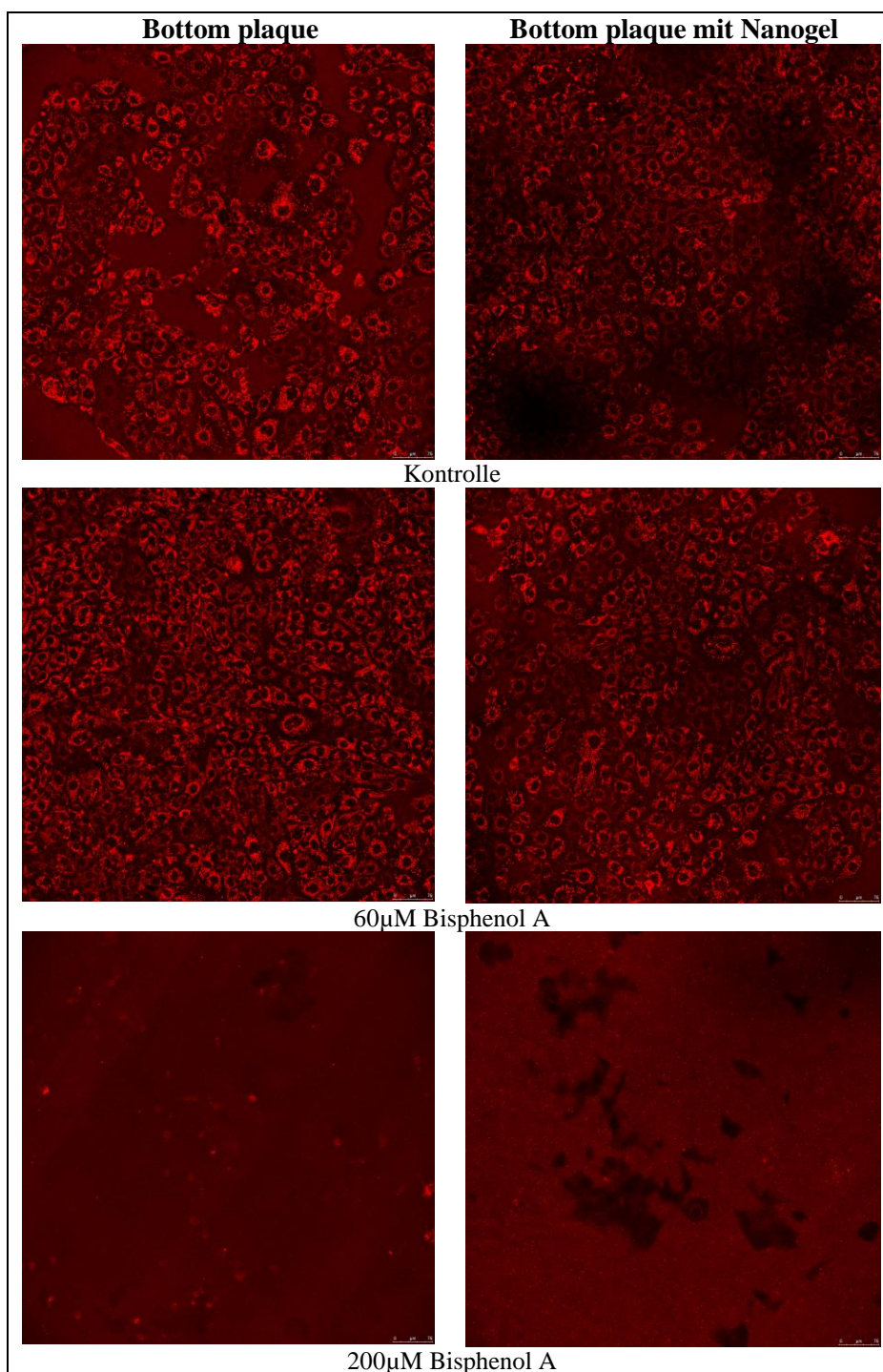


Abbildung 17: Konfokalmikroskopie

Es ist deutlich erkennbar, dass bei der Kontrolle und bei 60µM Bisphenol A die meisten Zellen sehr gut zu erkennen sind. Bei 200µM Bisphenol A hingegen sind keine Zellen mehr erkennbar.

4.8 Semiquantitative PCR

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der durch PCR vervielfältigten synthetisieren cDNA konnten folgende Bilder von den Gelen gemacht werden. In Abbildung 18 ist das Gel zu sehen, bei dem auf GAPDH geprüft wurde. Dieses Gen wird als house keeping-Gen verwendet und dient als Kontrolle, ob die cDNA-Synthese funktioniert hat, da es in allen Zellen vorkommt. Es ist zu erkennen, dass bei allen Proben Banden zu erkennen sind bei einer Größe von ca. 350 bp.

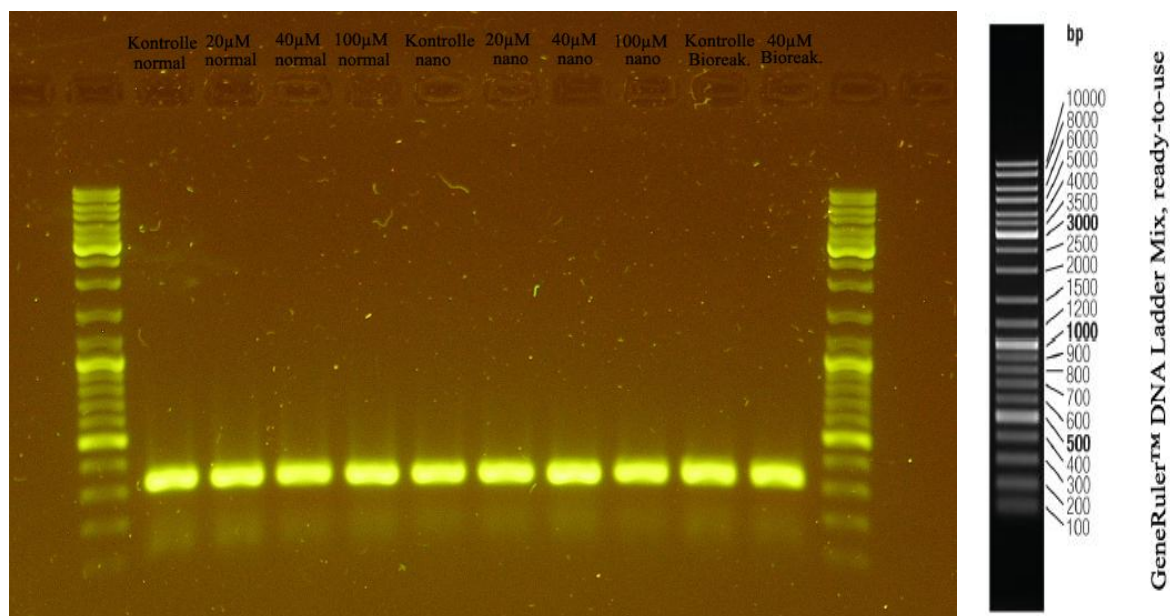


Abbildung 18: Ergebnis der PCR mit GAPDH (links) und Marker (rechts)

In Abbildung 19 ist das Gel zu sehen, bei dem die Proben auf das Gen Fmo1 getestet wurde. Das daraus synthetisierte Protein ist am oxidativen Stoffwechsel einer Vielzahl von Xenobiotika beteiligt. Hier sind Banden bei 20µM-Bisphenol A-normal-, Kontrolle-Bisphenol A-nano-, 40µM-Bisphenol A-nano und 100µM-Bisphenol A-nano-Kultivierung zu erkennen bei einer Größe von ca. 60 bp.

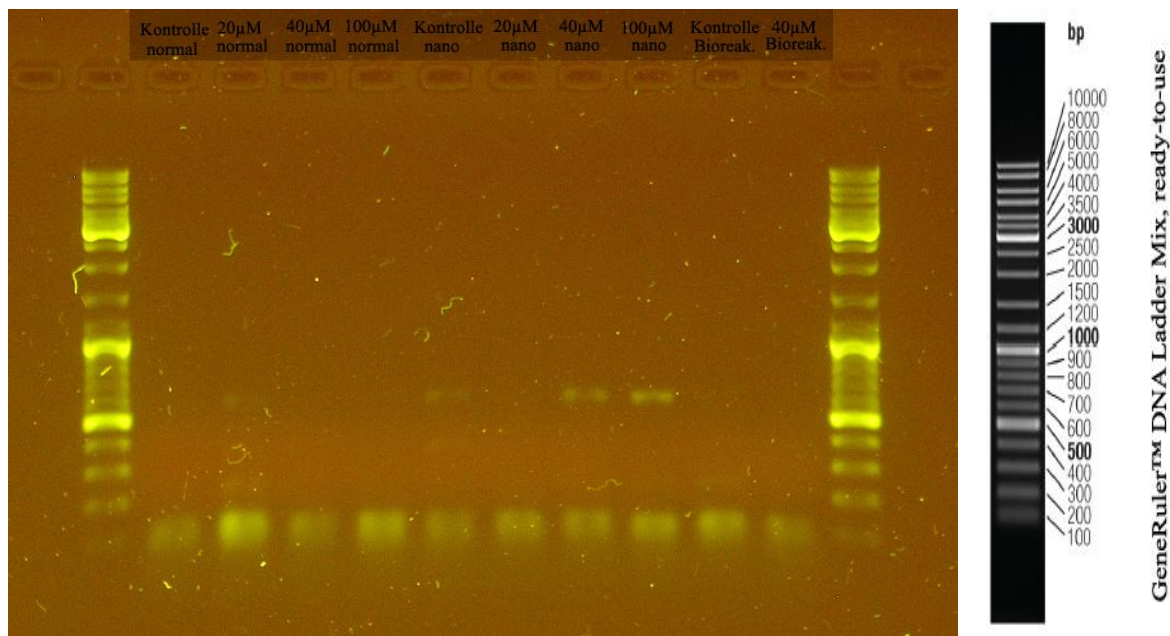


Abbildung 19: Ergebnis der PCR mit Fmo1 (links) und Marker (rechts)

Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse beim Testen der Proben auf das Gen Cyp2e1, ein Gen der Cytochrom P450 Familie. Das synthetisierte Protein verstoffwechselt verschiedene Chemikalien. Hier sind jedoch keine Banden zu erkennen.

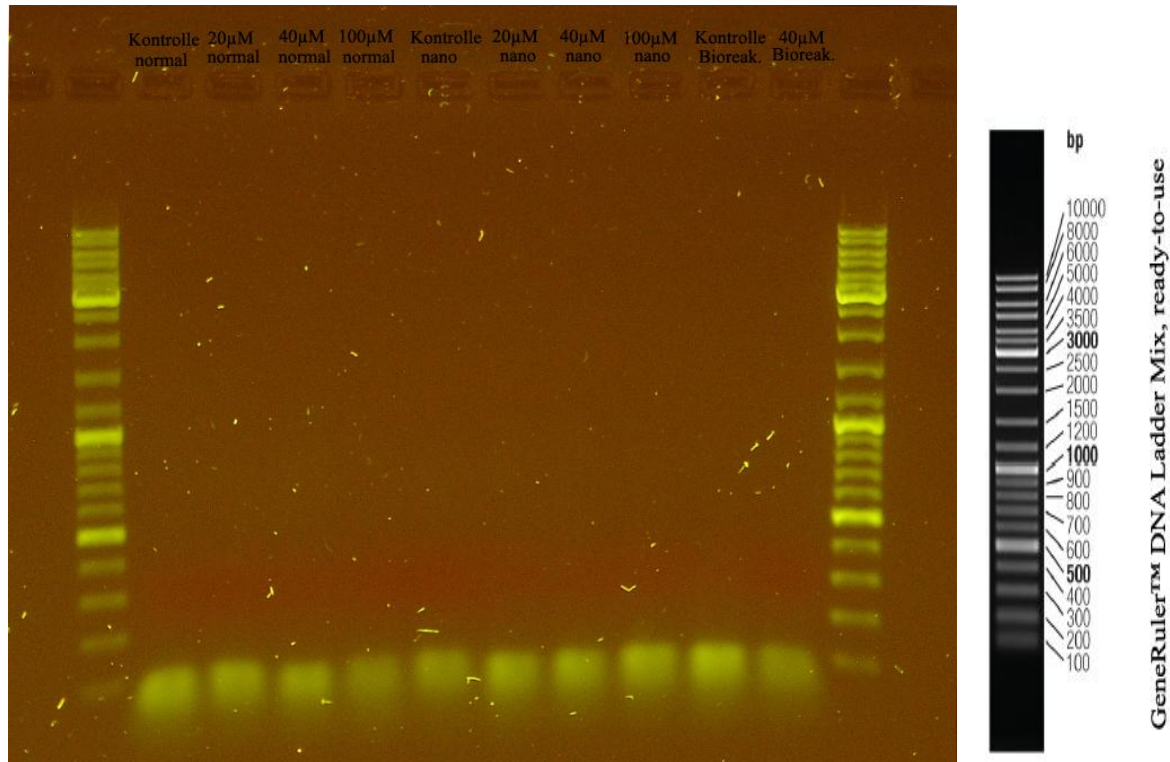


Abbildung 20: Ergebnis der PCR mit Cyp2e1 (links) und Marker (rechts)

Die Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse beim Testen der Proben auf das Gen Cyp1a2, ebenfalls ein Gen der Cytochrom P450 Familie. Das daraus gebildete Enzym dient wie Fmo1 dem Stoffwechsel von Xenobiotika. Hier sind Banden bei 20 μ M- und 40 μ M-Bisphenol A-normal-Kultivierung zu erkennen bei einer Größe von ca. 550 bp.

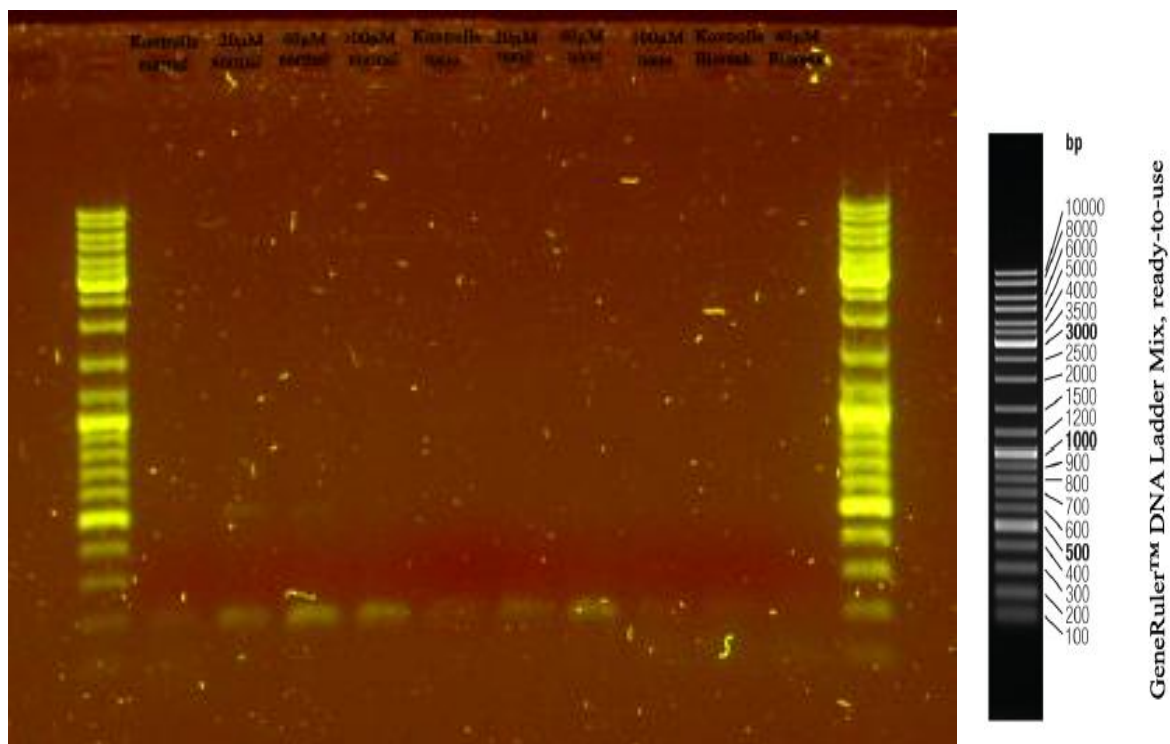


Abbildung 21: Ergebnis der PCR mit Cyp1a2 (links) und Marker (rechts)

4.9 Western Blot

Die Färbung des Gels mit der Coomassie-Lösung ist in Abbildung 22 zu sehen. Hier ist zu erkennen, dass keine Banden nach dem Blotten mehr zu sehen sind. Dies konnte auf allen Gelen beobachtet werden.

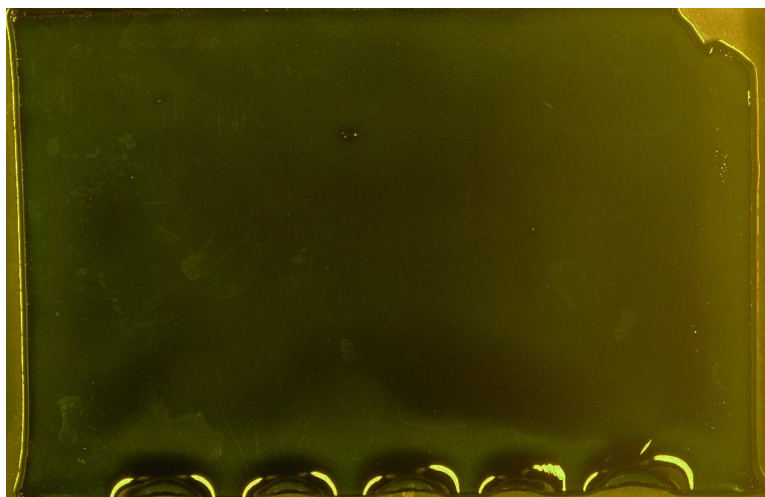


Abbildung 22: Coomassie-gefärbtes Gel

In den folgenden Abbildungen sind die Membranen mit den Proteinproben für die Kultivierung ohne und mit Nanogel und auf Bioreaktoren mit Nanogel nach der Zugabe von Bisphenol A zu sehen. In Abbildung 23 kann man keine Banden erkennen. Bei den anderen beiden (Abbildung 24 und 25) sind schmierige Banden im oberen Teil der Membran zu sehen.

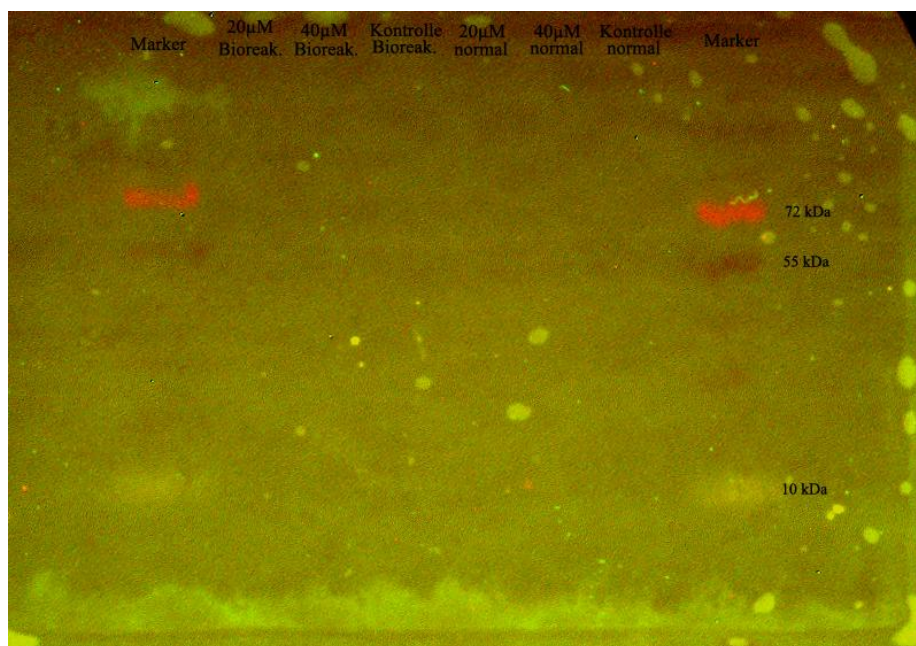


Abbildung 23: Ponceau S-gefärbte Membran

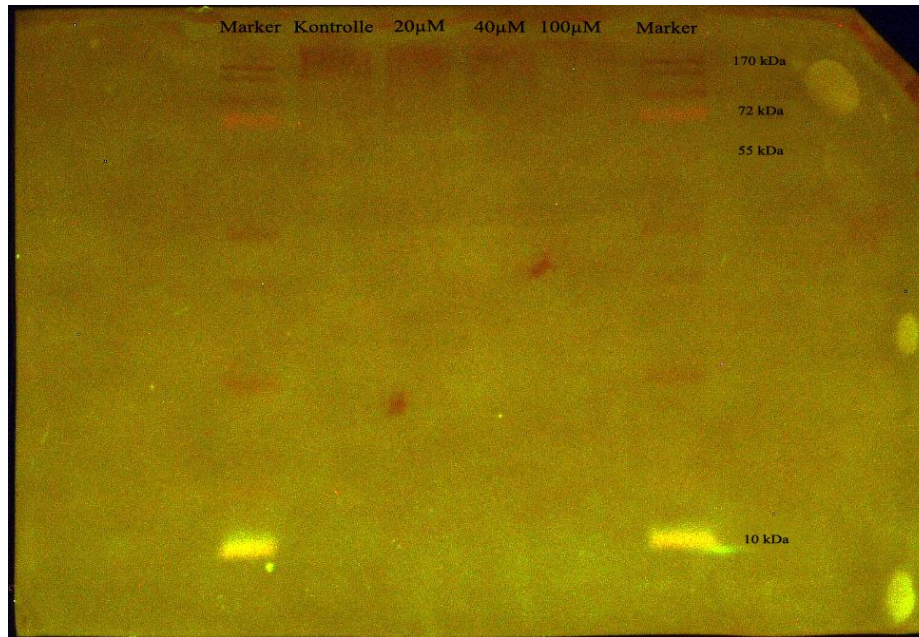


Abbildung 24: Ponceau S-gefärbte Membran mit Proteinproben für die Kultivierung ohne Nanogel

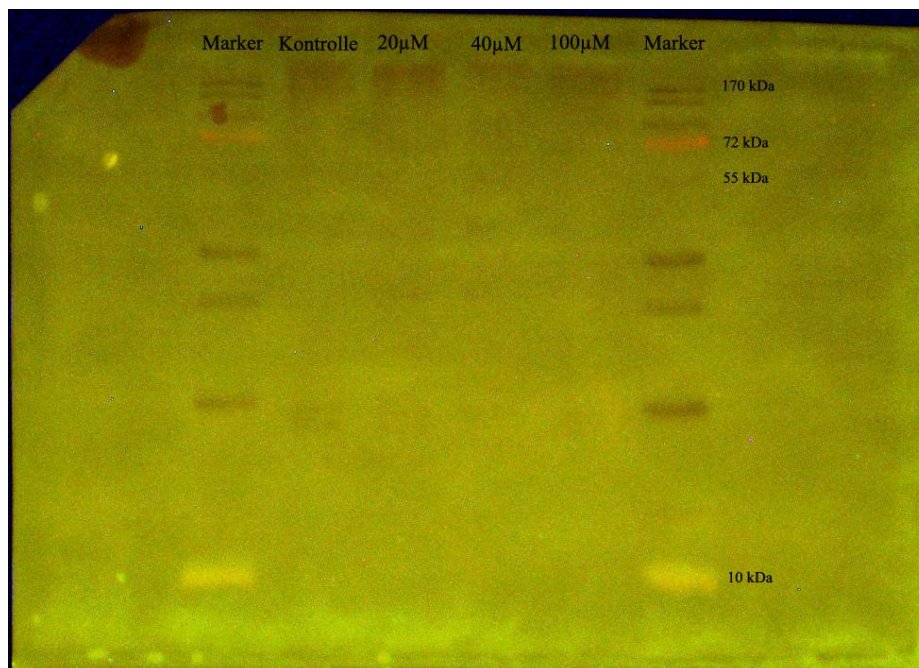


Abbildung 25: Ponceau S-gefärbte Membran mit Proteinproben für die Kultivierung mit Nanogel

Ebenfalls nichts zu sehen, war nach der Antikörperfärbung, sodass keine Bilder von den Membranen gemacht wurden.

5 Auswertung/Diskussion

Die Kultivierung auf Bioreaktoren zeigte sich in dieser Arbeit als sehr schwierig. Die Zellen konnten meist gar nicht an das Nanogel heften und somit für die Versuche nicht verwendet werden. Die Bioreaktorkultivierung gelang nur sehr selten und dann auch nicht optimal. Die Ergebnisse mit diesen Zellen können für diese Arbeit leider nicht verwendet werden. Die Bilder in Abbildung 9 (rechte Bilderreihe) zeigen, dass die Zellen in allen Fällen nicht gut aussehen. Dies wird auch mittels des MTT- und des LDH-Tests belegt. Hier (in Abbildung 13 und 15) ist ein auf und ab der Balken zu beobachten, was bedeutet das alle Zellen geschädigt sind und somit keine Rückschlüsse auf die verwendeten Bisphenol A-Konzentrationen gemacht werden können. Gründe für das schlechte Anhaften der Zellen könnte sein, dass das Nanogel auf der Folie des Bioreaktors nicht optimal anheften konnte, weil diese vielleicht zu alt oder die Oberfläche beschädigt war. Die Zellen benötigen aber das Nanogel, um in dem Bioreaktor wachsen zu können, da die Zellen auf der Folie allein nicht adhäsieren können. Diese Kultivierungsart sollte die Bedingungen im Körper besser nachahmen, als eine normale Kultivierung auf Well-Platten. Um wenigstens die 3D-Kultivierung verwenden zu können, wurden normale Well-Platten mit Nanogel beschichtet und die erlangten Ergebnisse mit den Ergebnisse der 2D-Kultivierung aus den Vorversuchen zu vergleichen. Die Ergebnisse zeigen in beiden Fällen, dass Bisphenol A ab gewissen Konzentrationen toxisch für die Zellen der Zelllinie RLC-18 wirkt. Dies geschieht bei beiden Kultivierungsarten meist um einen Wert von 100-200 μ M, was sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden Einwirkzeit der Fall ist. Belegt werden kann dies mit den Abbildungen 9 und 10, wo nach 100 μ M nur noch tote Zellen zu erkennen sind. Zwischen 1 μ M und 100 μ M gibt es kaum Unterschiede in den geschädigten Zellen. Die Fotos von dem live/dead-Assay (Abbildung 11 und 12) belegen ebenfalls, dass ab 200 μ M die Zellen vermehrt sterben. Es sind zwar bei 10 μ M Bisphenol A und in der Kontrolle ein paar rot gefärbte Zellen zu sehen, was aber an der Masse an gewachsenen Zellen liegt, wodurch durch Platzmangel einige Zellen absterben können. Somit kann man daraus schließen, dass eine Konzentration von 10 μ M sehr gut von den RLC-18-Zellen vertragen werden kann. Auch die Diagramme aus den MTT-Tests und LDH-Tests belegen, dass ab einer Konzentration von ca. 200 μ M Bisphenol A die Zellen diese nicht mehr vertragen können. Hier ist im Vergleich zu den Bildern jedoch ein Unterschied zwischen 24 und 48 Stunden Einwirkzeit zu erkennen, ebenfalls auch zwischen den zwei Kultivierungsarten. Die Werte bei 24h liegen deutlich höher beim MTT-Test und niedriger beim LDH-Test als bei 48h. Das heißt, dass die Zellen nach 24h noch vitaler bei einer

Konzentration von ca. 200µM Bisphenol A waren, weil sie mehr MTT abgebaut und weniger LDH produziert haben. Ein weiterer Grund für diesen Unterschied kann aber auch sein, dass sich die lebenden Zellen weiter noch vermehrt haben und so mehr Zellen zur Verfügung standen LDH und Formazan zu bilden. Es werden beide Gründe zu den Unterschieden in den Werten geführt haben. Zwischen den einzelnen Konzentrationen, gerade im vorderen Bereich, kann man weiterhin einige Schwankungen erkennen. Dies könnte zum einen daran liegen, dass unterschiedlich stark die Zellen gewachsen sind, zum anderen, dass die Lösungen mit den verschiedenen Bisphenol A-Konzentrationen nicht optimal durchmischt und so auch unterschiedlich stark auf den Wells verteilt waren, sodass es an einigen Stellen intensiver gewirkt hat, als an anderen. Man kann jedoch auch deutlich erkennen, dass die Standardabweichungen zum Teil sehr groß sind (z.B. bei 60µM Bisphenol A normal in Abbildung 14). Dies liegt daran, dass nur wenige Testwerte vorlagen und somit abweichende Werte noch stark ins Gewicht fallen konnten. Schwankungen sind auch unter dem Verlauf der Balken extrem bei den MTT-Tests mit der Nanogelkultivierung zu beobachten. Dies lässt sich mit der Kultivierungsform erklären. Es ist möglich, dass sich das Nanogel nicht optimal auf den Platten verteilte und somit zu einer unterschiedlichen Verteilung von 2D- und 3D-Wachstum kam. Dies führt zu einer unterschiedlichen Anzahl an Zellen in den Wells, wodurch während des MTT-Tests auch unterschiedlich Formazan gebildet wurde. Dies wirkt sich aber nicht auf die Beobachtung auch, dass ab 200µM Bisphenol A vermehrt die Zellen sterben. Um aber starke Schwankungen verhindern zu können, ist es für weitere Arbeiten an diesem Thema wichtig, die Tests mehrfach durchzuführen, damit eine ausreichende Menge an Werten zur Verfügung steht. Weiterhin sind Unterschiede zwischen der normalen Kultivierung und der Nanogelkultivierung zu erkennen, die aber auch keine Auswirkung auf die eben genannte Beobachtung haben. Jedoch ist eindeutig zu erkennen, dass die Werte bei dem MTT- und LDH-Test der Nanogelkultivierung höher liegen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei der 3D-Kultivierung mit Nanogel mehr Zellen wachsen können, als bei der 2D-Kultivierung, und somit in den Tests mehr Formazan gebildet wird bzw. mehr LDH zur Verfügung steht. Die 3D-Struktur des Wachstums der Zellen ist gut in der Abbildung 10 bei 10µM Bisphenol a zu erkennen. Insgesamt ist eindeutig zu beobachten, dass Konzentrationen ab ca. 100-200µM von Bisphenol A akut toxisch für die embryonalen Leberzellen der Ratte sind unabhängig von der Einwirkzeit und von der Kultivierungsart.

Der Versuch zur Überprüfung der Mitochondrien belegt dies ebenfalls. In Abbildung 17 sind bei der Kontrolle und bei 60µM Bisphenol A noch sehr viele gefärbte Mitochondrien erkennbar, wogegen bei 200µM Bisphenol A nur noch vereinzelt gefärbte Mitochondrien zu sehen sind. Bei der Kontrolle und bei 60µM Bisphenol A sind Unterschiede in der Intensität der Färbung zu erkennen. Dies kann eine Schädigung bedeuten, oder die Mitochondrien konnten hier nicht genug Marker aufnehmen, weil sie dafür ein gewisses Potential benötigen. Eine weitere Erklärung bei der 3D-Kultivierung ist, dass hier die Zellen in mehreren Ebenen wachsen und so auch unterschiedliche Ebenen aufgenommen wurden. Da hier alle Bilder addiert wurden, kann es zu so unterschiedlichen Tiefen kommen, die als hellere und dunklere Bereiche zu erkennen sind.

Die Toxizität von Bisphenol A soll ebenfalls mittels Western Blot und PCR beurteilt werden. Die Ergebnisse von dem Western Blot können leider für diese Arbeit nicht verwendet werden. Wie in Abbildung 23, 24 und 25 zu erkennen, sind keine bzw. nur verschmierte Banden im oberen Bereich der Membran zu sehen. Da bei der Coomassie-Färbung (Abbildung 22) keine Banden auf dem Gel zu sehen waren, kann man davon ausgehen, dass sie vom Gel auf die Membran geblottet werden. Dass in Abbildung 23 keine Banden zu sehen waren, kann daran liegen, dass nicht genügend Proteinmenge eingesetzt wurde. Des Weiteren handelt es sich um die Membran, die mit dem Antikörper „Monoclonal Anti-Rat Cytochrom P450 (1A1/1A2)“ gefärbt wurde. Somit kann man daraus schließen, dass dieses Enzym nicht gebildet wurde. Die anderen beiden Membranen wurden zunächst mit dem Antikörper „Monoclonal Anti- α -Tubulin Clone B-5-1-2“ gefärbt, um zu kontrollieren, ob der Blot überhaupt funktioniert hat. Da hier nur verschmierte Banden im oberen Bereich der Membran zu sehen sind, lässt sich vermuten, dass schon bei dem Beladen der Taschen bei der Elektrophorese Probleme aufgetaucht sind. So kann man annehmen, dass die Proben nicht optimal in die Taschen gesunken sind und sich so nicht auftrennen konnten. Die Ursache dafür kann in der Isolierungsmethode liegen. Dies kann ebenfalls mit der Antikörperfärbung belegt werden, wo selbst bei der Kontrollfärbung mit Anti- α -Tubulin keine Ergebnisse erzielt wurden. Es müsste in weiteren Versuchen untersucht werden, ob Ergebnisse mit einer anderen Art der Isolierung der Proteine erzielt werden könnten.

Die Ergebnisse der PCR können allerdings verwendet werden. Beim Test auf GAPDH (Abbildung 18), das als house keeping-Gen als Kontrolle der cDNA-Synthese dient und in ausreichender Menge vorliegen sollte, sind bei jeder Probe Banden zu erkennen. Damit kann man sagen, dass die cDNA-Synthese in allen Fällen funktioniert hat. Der Test auf das Gen Fmo1 (Abbildung 19) zeigte Banden bei 20µM-Bisphenol A-normal-, Kontrolle-Bisphenol A-

nano-, 40µM-Bisphenol A-nano und 100µM-Bisphenol A-nano-Kultivierung. Da hier unterschiedlich die Banden aufgetreten sind, kann man davon ausgehen, dass bei den anderen Proben nicht genügend Material synthetisiert wurde oder bei der Isolierung Material verloren gegangen sein konnte. Somit ist es möglich, dass die Fluoreszenz von Sybr Safe nicht ausreichte, um mit UV-Licht aufgenommen werden zu können, da möglicherweise zu wenig DNA-Material vorlag, in das sich Sybr Safe einlagern konnte. Jedoch ist auch eine Bande bei Kontrolle-Bisphenol A-nano zu erkennen. Hier sollte keine Bande auftreten, da kein Bisphenol A zugegeben wurde. Die Bande lässt sich mit einer Verunreinigung der Probe erklären, die bei der Isolierung und den weiteren durchgeführten Methoden entstanden sein kann. Eine ähnliche Beobachtung kann bei dem Test auf das Gen Cyp1a2 (Abbildung 21), mit Banden bei 20µM- und 40µM-Bisphenol A-normal-Kultivierung. Auch hier kann wie bei dem Gen Fmo1 argumentiert werden. Jedoch sind bei allen Proben der Nanogelkultivierung keine Banden zu erkennen. Entweder wurde das Gen nicht exprimiert oder es war ebenfalls nicht genügend DNA-Material vorhanden und die Fluoreszenz von Sybr Safe hat nicht ausgereicht. Man kann aber erkennen, dass in einigen Proben diese Gene gebildet wurden. Dies ist somit ein Anzeichen dafür, dass ein Xenobiotika, zu denen auch Bisphenol A zählt, anwesend war, was zu einer Expression von Genen führte, die dieses durch Bildung entsprechender Enzyme verstoffwechselt. Bei dem Test auf das Gen Cyp2e1 (Abbildung 20) konnten keine Banden verzeichnet werden. Entweder wurde das Gen hier nicht exprimiert oder es war ebenfalls nicht genügend DNA-Material vorhanden, sodass die Fluoreszenz von Sybr Safe nicht ausgereicht hat. Es müsste aber in allen Fällen die Versuche wiederholt werden, um etwaige Fehler auszuschließen.

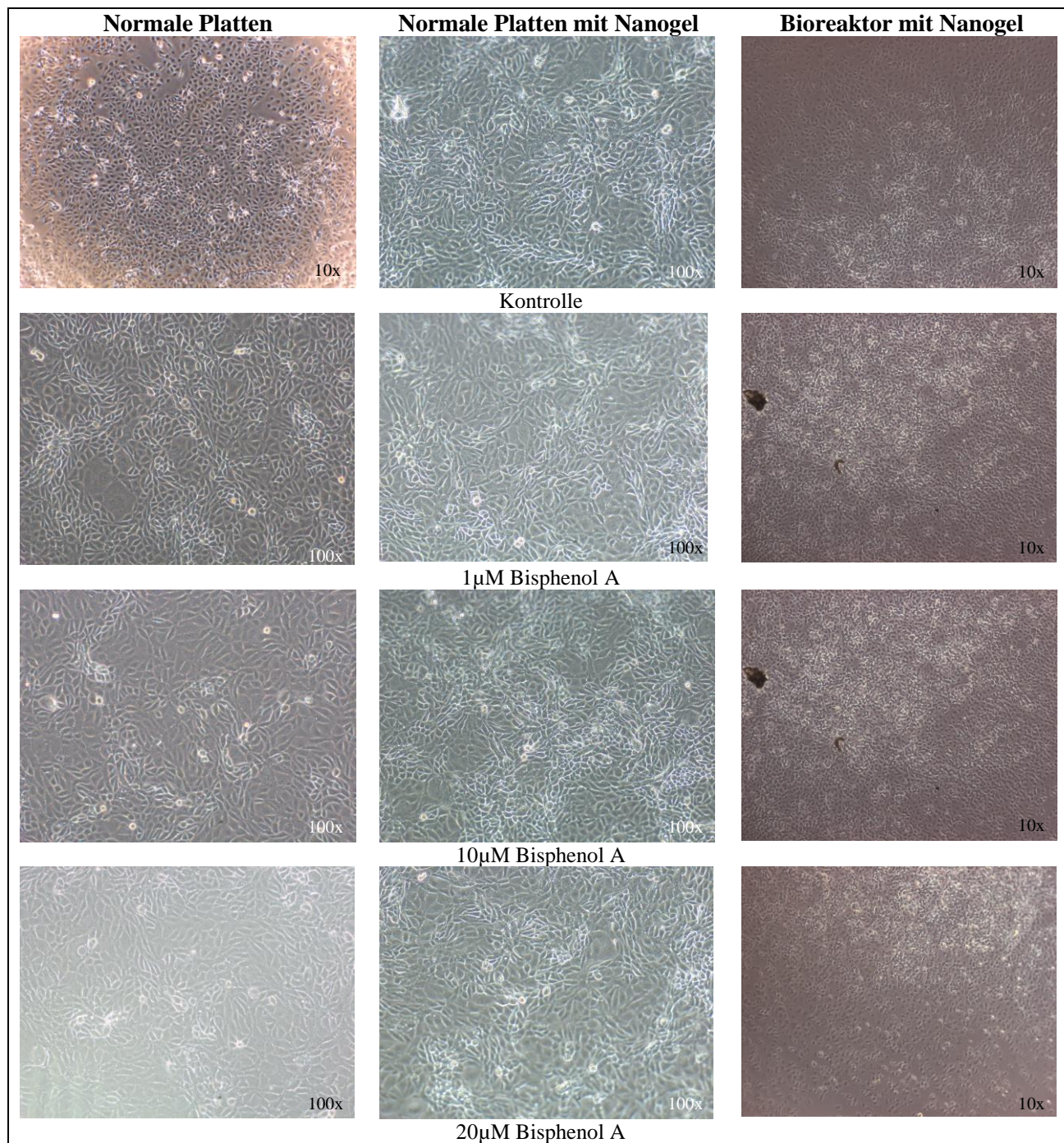
6 Zusammenfassung

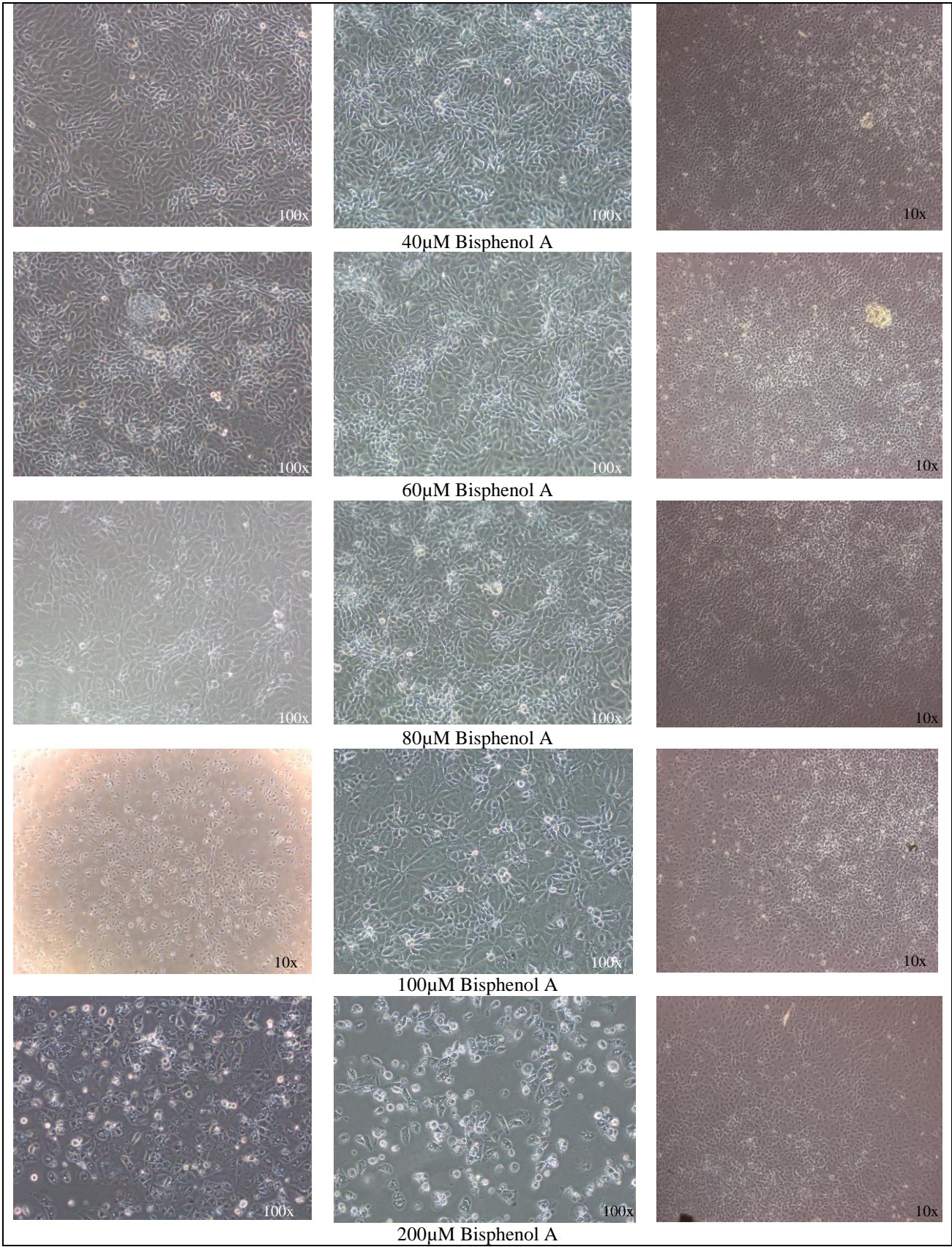
Zusammenfassend kann man also sagen, dass embryonale Leberzellen der Ratte Konzentrationen ab ca. 100-200µM von Bisphenol A meist nicht verkraften können und sterben. Dies wurde mittels live/dead-Assay, MTT-Test und LDH-Test bewiesen. Ein weiterer Beleg, dass Bisphenol A toxisch für die embryonalen Leberzellen der Ratte ist, konnte durch PCR nachgewiesen werden. Hier wurden Gene exprimiert, welche für die Bildung von Enzymen verantwortlich sind, die diesen Stoff verstoffwechseln können. Die unterschiedlichen Kultivierungsmethoden zeigten keinen nennenswerten Einfluss auf die Ergebnisse. Für menschliche adulte Zellen lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass die verwendeten Konzentrationen von Bisphenol keine nennenswerte Schädigung hervorrufen. Dies lässt sich mit dem Referenzbereich für die LDH-Aktivität der Menschen belegen, welche allgemein unter 245 U/l liegt. Jedoch können die höheren Konzentrationen Auswirkungen auf menschliche Embryonen bis Kleinkinder haben, da hier die Leber noch in der Entwicklung bzw. noch nicht ausgewachsen ist. Die tolerierbare tägliche Aufnahmemenge liegt bei 50 µg/kg Körpergewicht. Bei einer Konzentration von 1mM Bisphenol A in den eingesetzten 500µl sind 115µg enthalten. Wenn humane Embryonen dieser Menge ausgesetzt werden, kann man davon ausgehen, dass sie ebenfalls wie die Zellen im Versuch geschädigt werden, da es deutlich die tolerierbare tägliche Aufnahmemenge überschreitet. Jedoch müsste dies mit Versuchen an solchen Zellen belegt werden, um diese Behauptung zu stützen. Denn es gibt wesentliche Artenunterschiede zwischen Ratten und Menschen, die unter anderem die toxikodynamische Empfindlichkeit gegenüber Östrogenen betreffen. So kann nicht immer von Nagetieren auch auf den Menschen geschlossen werden. Jedoch lassen sich Vermutungen anstellen, mit Hilfe der man Grenzwerte festlegen kann. Ebenfalls hilfreich können weitere Studien zur Klärung der hormonellen Wirkung von Bisphenol A auf den Menschen sein. Als persönliches Fazit würde ich sagen, dass man in der Schwangerschaft, bei Babys und Kleinkindern auf Produkte, die Bisphenol A enthalten können, verzichten sollte, um eine mögliche Schädigung zu vermeiden.

Anhang

1 Fotos 24h nach Zugabe von Bisphenol A

In folgender Abbildung sind alle Bilder 24h nach der Zugabe der verschiedenen Bisphenol A-Konzentrationen zu sehen.





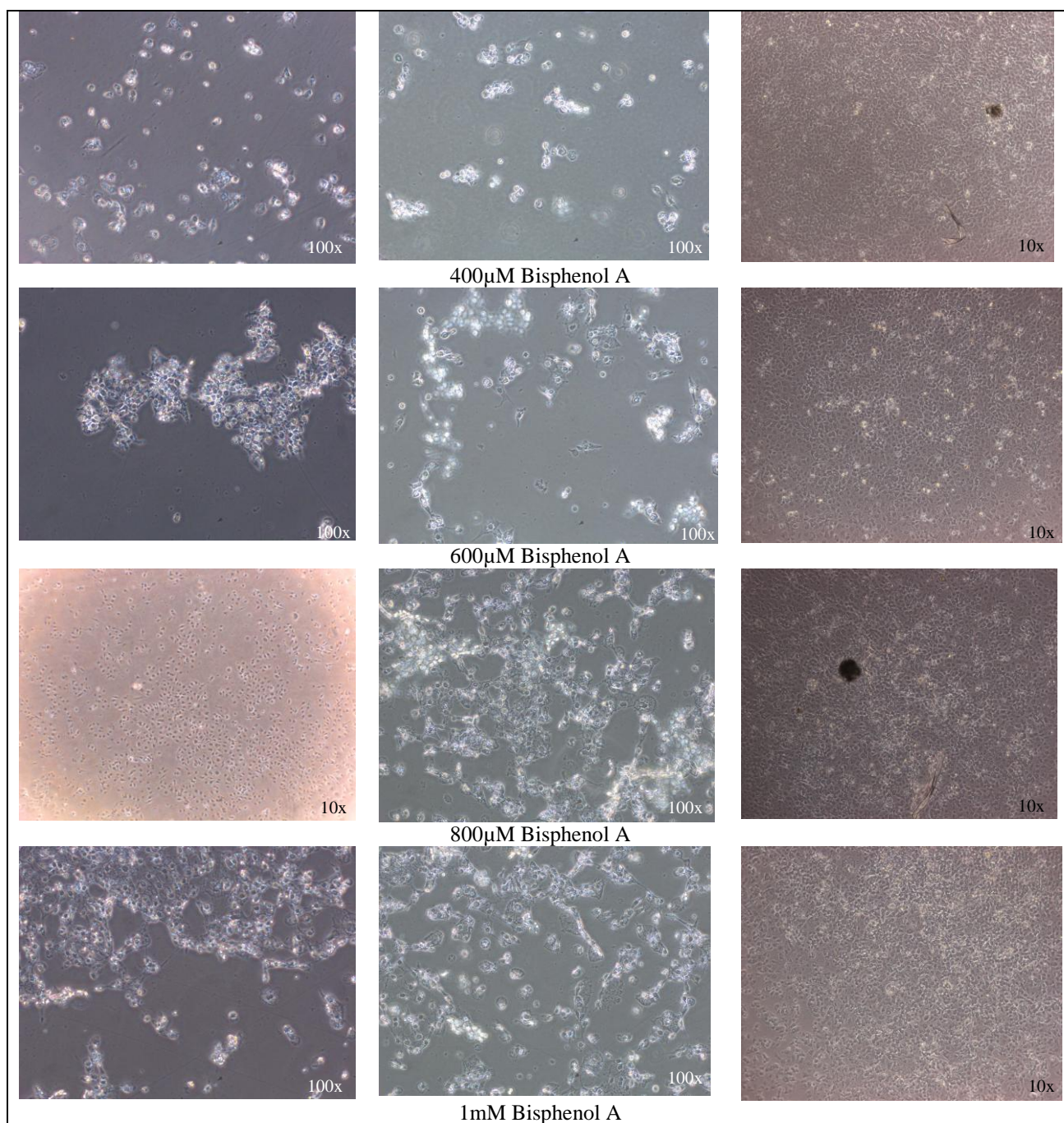
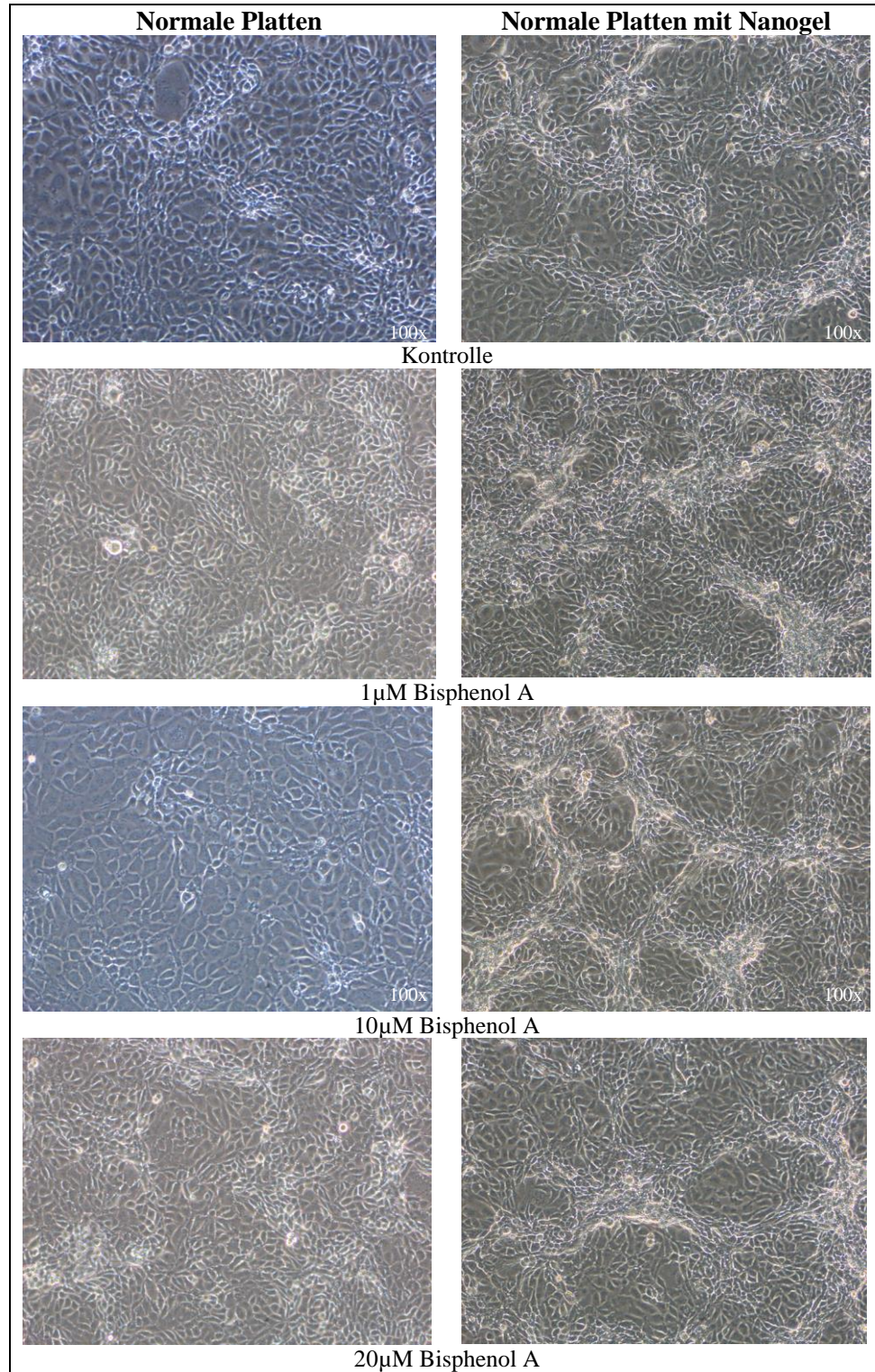
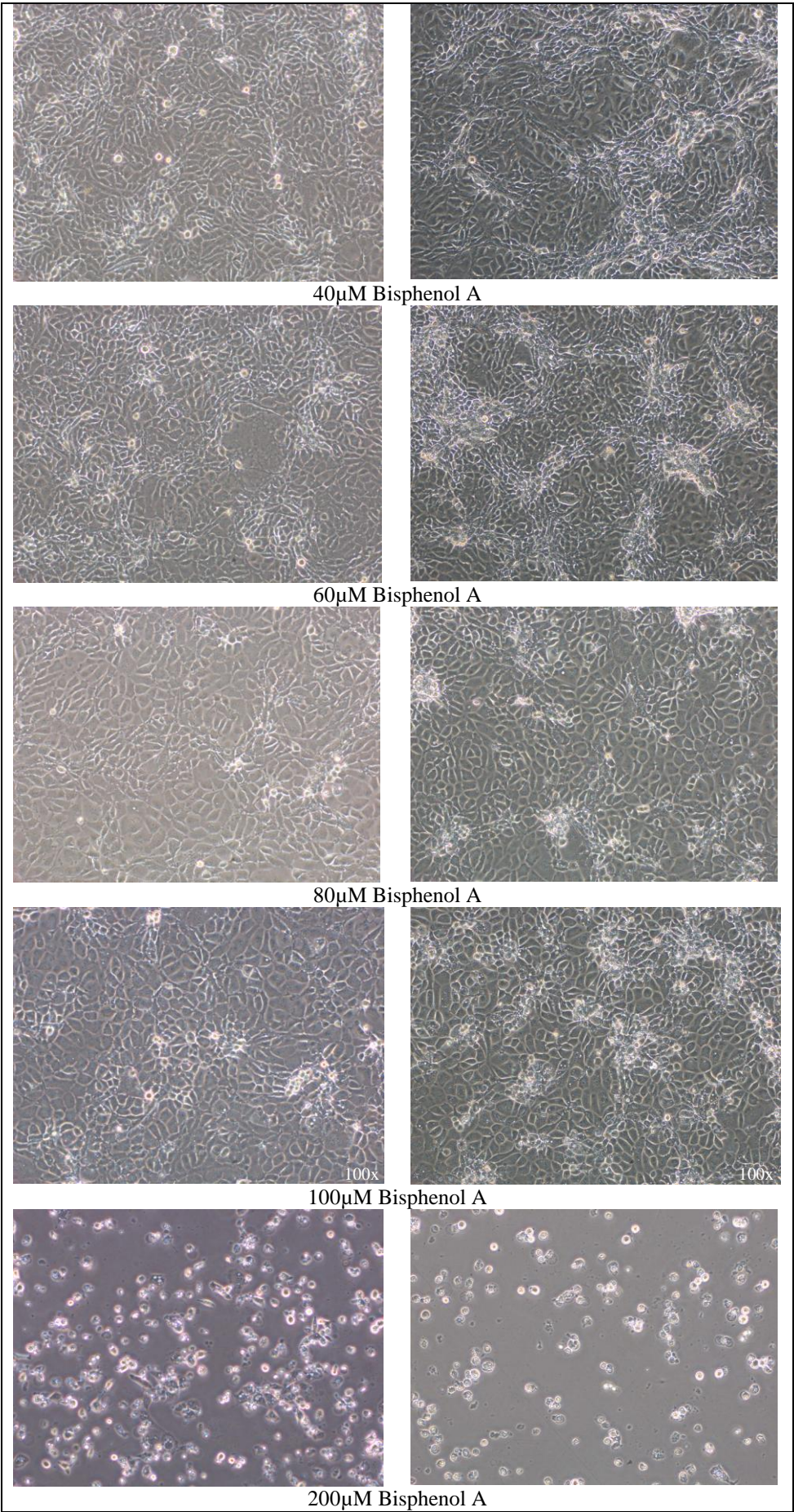


Abbildung 26: alle Bilder 24h nach Zugabe von Bisphenol A

2 Fotos 48h nach Zugabe von Bisphenol A

In folgender Abbildung sind alle Bilder 48h nach der Zugabe der verschiedenen Bisphenol A-Konzentrationen zu sehen.





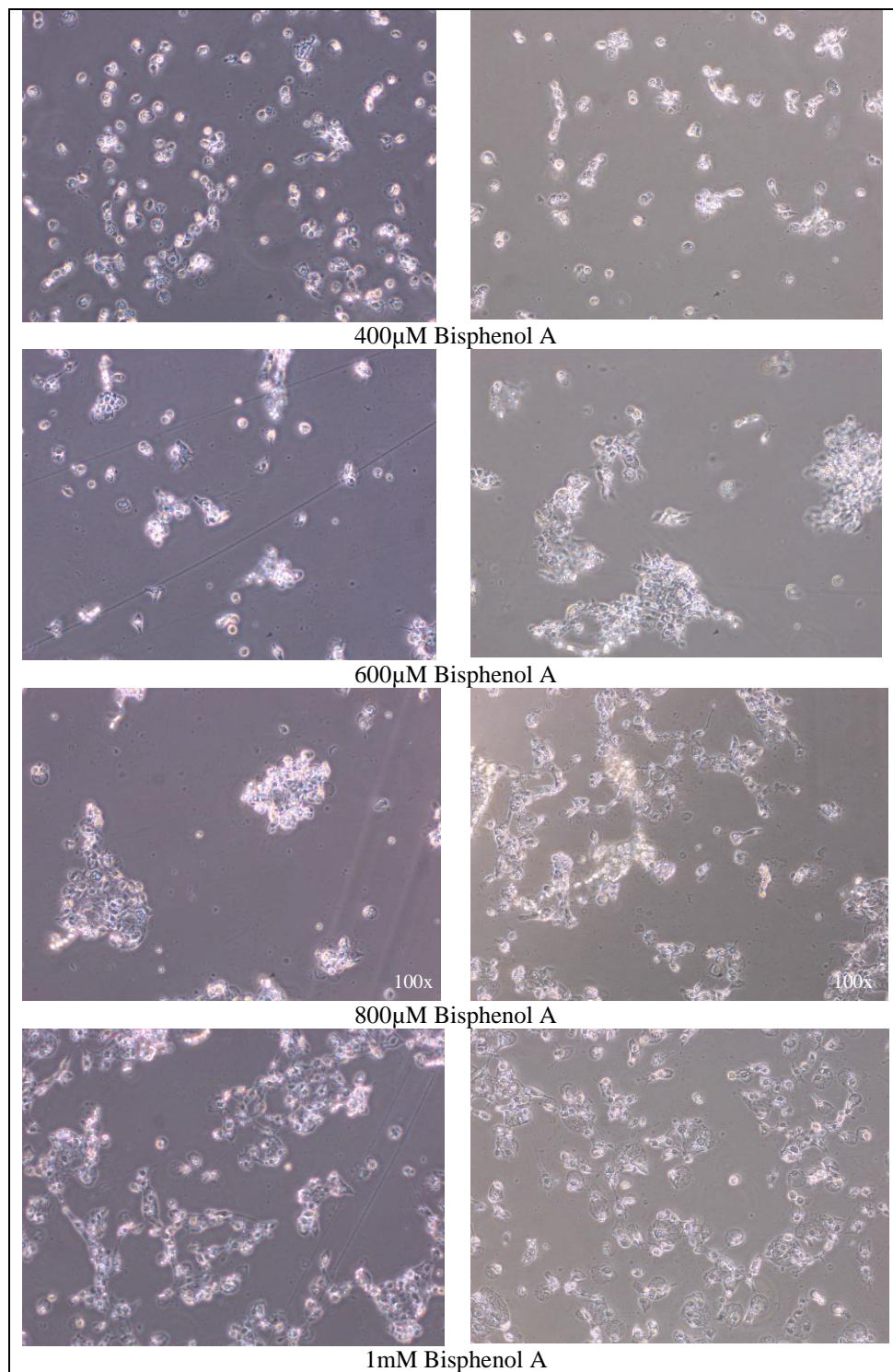


Abbildung 27: alle Bilder 48h nach der Zugabe von Bisphenol A

Literaturverzeichnis

[Autor unbekannt a, 2010]

Autor unbekannt: Lactatdehydrogenase. URL: <<http://de.wikipedia.org/wiki/Lactatdehydrogenase>>, verfügbar am 06.04.2010

[Autor unbekannt b, 2010]

Autor unbekannt: Zytotoxizitätsprüfungen (Neutralrot-, Trypanblau- und MTT-Test). URL: <<http://www.baltic-analytics.de/index.php?id=39>>, verfügbar am 08.04.2010

[Autor unbekannt c, 2010]

Autor unbekannt: Glossar: reverse Transkriptasen. URL: <http://www.chemgapedia.de/vsengine/popup/vsc/de/glossar/r/re/reverse_00032transkriptasen.glos.html>, verfügbar am 12.08.2010

[Autor unbekannt d, 2010]

Autor unbekannt: cDNA. URL: <<http://www.wissen.de/wde/generator/wissen/ressorts/natur/naturwissenschaften/indexoffline,page=1073010.html>>, verfügbar am 12.08.2010

[Autor unbekannt e, 2010]

Autor unbekannt: Glossar: Polymerase-Kettenreaktion. URL: <http://www.chemgapedia.de/vsengine/popup/vsc/de/glossar/p/po/polymerase_00045kettenreaktion.glos.html>, verfügbar am 12.08.2010

[Autor unbekannt f, 2010]

Autor unbekannt: Cytochrom P450. URL: <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/11/toxikologie/kap_1/vlu/stoffwechsel.vlu/Page/vsc/de/ch/11/toxikologie/kap_1/kap1_5/kap15_4.vscml.html>, verfügbar am 12.08.2010

[Autor unbekannt g, 2010]

Autor unbekannt: Theorie zum Western Blot. URL: <<http://hikwww8.fzk.de:8080/imb/bionmr/teaching/Westernblot.pdf>>, verfügbar am 12.08.2010

[Autor unbekannt h, 2010]

Autor unbekannt: Western Blot: Hintergrundinformationen. URL: <<http://www.antikoerper-online.de/resources/17/622/Western+Blot+Hintergrundinformationen/>>, verfügbar am 12.08.2010

[Autor unbekannt i, 2010]

Autor unbekannt: Bisphenol A. URL: <http://de.wikipedia.org/wiki/Bisphenol_A>, verfügbar am 15.03.2010

[Autor unbekannt j, 2007]

Autor unbekannt: Gutachten des Wissenschaftlichen Gremiums AFC über 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPAN (Bisphenol A). URL: <http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753824_1178620772817.htm>, verfügbar am 15.03.2010

[Autor unbekannt k, 2009]

Autor unbekannt: Faktenblatt: Bisphenol A. URL: <http://www.bag.admin.ch/themen/lebensmittel/04861/06170/index.html?lang=de&download=NHZLpZeg7t,lnp6I0NTU042I2Z6InIacy4Zn4Z2qZpnO2Yuq2Z6gpJCHelJ8e2ym162epYbg2c_JjKbNoKSn6A-->>, verfügbar am 20.08.2010

[Autor unbekannt l, 2010]

Autor unbekannt: Bisphenol A: Massenchemikalie mit unerwünschten Nebenwirkungen. URL: <<http://www.umweltbundesamt.de/uba-info-medien/3782.html>>, verfügbar am 20.08.2010

[Bode, 2004]

Bode, Maren: Studien zum Metabolismus von Pestiziden und Xenobiotika durch humane Cytochrom P450-Monooxygenasen in transgenen Tabakzellkulturen. URL: <http://sylvester.bth.rwth-aachen.de/dissertationen/2004/238/04_238.pdf>, verfügbar am 12.08.2010

[Dekant, Völkel, 2008]

Dekant W, Völkel W: Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 228 (2008): Seite 114–134

[Gerecke, 2006]

Gerecke, Christian: In *vivo*- und in *vitro*-Komplementaktivierung durch den monoklonalen CD20-Antikörper Rituximab bei der Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen. URL: <<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/gerecke-christian-2006-06-27/HTML/chapter2.html>>, verfügbar am 08.04.2010

[Giri et al, 2010]

Giri, Shibashish; Nieber, Karen et al: Telomerase activity and hepatic functions of rat embryonic liver progenitor cell in nanoscaffold-coated model bioreactor. *Mol Cell Biochem* (2010) 336: Seite 137–149

[Goodsell, 2008]

Goodsell, David. Lactate Dehydrogenase. URL: <http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb102_1.html>, verfügbar am 06.04.2010

[Hübl, 2003]

Hübl, Wolfgang: LDH (Laktatdehydrogenase): Übersicht. URL: <http://www.med4you.at/laborbefunde/lbef2/lbef_ldh.htm>, verfügbar am 06.04.2010

[Hübl, 2004]

Hübl, Wolfgang: PCR: Polymerase Chain Reaction. URL: <http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/lbef_pcr.htm>, verfügbar am 12.08.2010

[Otto, von Mühlendahl, 2010]

Otto, M.; von Mühlendahl, K. E.: Bisphenol A. URL: <<http://www.allum.de/noxe/bisphenol-a.html>>, verfügbar am 20.08.2010

[Xing et al, 2010]

Xing, Lina; Xu, Yajun; et al: Embryonic and Teratogenic Effects of the Combination of Bisphenol A and Genistein on In Vitro Cultured Postimplantation Rat Embryos. Toxicological Sciences (2010) 115: Seite 557-588

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Köckritz, 13.09.2010